MARINA MORENO

**Avaliação de ferramentas para monitoria da infecção
por *P. multocida* em suínos**

São Paulo
2010

MARINA MORENO

**Avaliação de ferramentas para monitoria da infecção
por *P. multocida* em suínos**

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 Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador

Prof. Titular José Soares Ferreira Neto

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.2396
FMVZ

Moreno, Marina
Avaliação de ferramentas para monitoria da infecção por *P. multocida*
em suínos / Marina Moreno. -- 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: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. *Pasteurella multocida*. 2. Suínos. 3. Pneumonia. 5. PCR. 6. ELISA.
I. Título.

ERRATA

Folha Ficha catalográfica	Parágrafo 3	Onde se lê 39 f.	Leia-se 45 f.
Resumo	1	São Paulo, 2011	São Paulo, 2010
Abstract	1	São Paulo, 2011	São Paulo, 2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Influência do sítio de coleta na detecção de *Pasteurella multocida* em suínos através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)”, protocolado sob o nº 1973/2010, utilizando 120 (cento e vinte) suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/08/2010.

We certify that the Research “Influence of collect site in *Pasteurella multocida* detection in pigs through polymerase chain reaction (PCR)”, protocol number 1973/2010, utilizing 120 (one hundred twenty) pigs, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/11/2010.

São Paulo, 12 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MORENO, Marina

Título: Avaliação de ferramentas para monitoria da infecção por *P. multocida* em suínos.

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

A minha mãe amada, Edvirges Mücke Moreno (*in memoriam*).

Ao meu pai querido Antonio Mücke Moreno.

A minha amiga Lindaura da Silva Luquine.

Aos meus irmãos, Andrea, Conrado, Marcel e Barbara.

Aos meus sobrinhos Guilherme, Conrado, Emanuel, Vicente e Carol.

Aos meus cunhados e cunhadas.

Vocês todos são minha vida. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela minha formação acadêmica e pelas condições de trabalho proporcionadas.

Ao Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto e à Prof. Dr. Andrea Micke Moreno pela orientação, ajuda, apoio e oportunidades.

Aos amigos do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia que me ajudaram na realização deste trabalho de uma forma ou de outra, Débora Gobbi, João Marujo Neto, Mariana Morgado Hereny, Sergio de Mello Novita Teixeira, Melanie Gutjahr, Thaís Ferreira, Maria Roberta Felizardo, Renata Paixão, Danielle Raimundo, Cleise Ribeiro Gomes, Ana Paula Santos da Silva, Alexandre Abelardo Sanches, Cristina Roman Amigo, Maurício Cabral Dutra, Adriano Savoia Morales, Juliana Fragoso de Araujo, Tania Alen Coutinho.

Aos amigos mais recentes Vasco Túlio de Moura Gomes, Jucélia de Jesus Pereira, Maria José Louro, Pedro Henrique Filsner e Bruna Barbosa pela convivência destes últimos meses.

Ao veterinário Rodrigo de Barros Nogueira, responsável pelo Frigorífico Rajá Ltda – Carapicuíba / SP e a todos os funcionários pela ajuda, atenção e paciência.

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

RESUMO

MORENO, M. **Avaliação de ferramentas para monitoria da infecção por *P. multocida* em suínos [Assessment of tools for monitoring infection by *P. multocida* in pigs]**. 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pasteurella multocida é um importante patógeno para suínos, causando rinite atrófica progressiva, pneumonia, pleurite, e septicemia. Para implantação de estratégias de controle e prevenção desta infecção, torna-se necessário o conhecimento a respeito do perfil de disseminação do agente em condições naturais e em diferentes tipos de sistema de produção. Tendo em vista a inexistência de técnicas sorológicas padronizadas para esta finalidade na espécie suína, o presente estudo teve por objetivos avaliar em um grupo de 90 animais a influência de diferentes sítios de coleta de amostra na detecção de animais portadores de *P. multocida* através da PCR e comparar estes dados a detecção de anticorpos na espécie suína através de um kit de ELISA comercial registrado para detecção de anticorpos contra *P. multocida* em aves. Foram coletados suabes de cavidade nasal, suabes de tonsila e sangue de 90 animais em idade de abate provenientes de dois sistemas de produção de suínos. Dentre os 90 animais, 14 (15,55%) foram positivos para detecção de *P. multocida* em suabes nasais e nenhum foi positivo em suabe de tonsila. Através do ELISA, 25 (27,77%) animais apresentaram anticorpos contra o agente. Através da análise de comparação de proporção, houve diferença significativa em relação à metodologia de diagnóstico nos diferentes testes realizados considerando-se valor de $p < 0,0001$ e intervalo de confiança de 95%. Ou seja, a frequência de positivos foi significativamente maior no teste de ELISA, seguido pela reação em cadeia pela polimerase em suabes nasais, sugerindo que a cavidade nasal é o sítio primário de colonização dos animais por este agente e que o ELISA testado pode ser facilmente adaptado para avaliação do perfil sorológico do agente na espécie suína.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*. Suínos. PCR. ELISA

ABSTRACT

MORENO, M. **Assessment of tools for monitoring infection by *P. multocida* in pigs [Avaliação de ferramentas para monitoria da infecção por *P. multocida* em suínos]**. 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pasteurella multocida is an important pathogen for pigs, causing progressive atrophic rhinitis, pneumonia, pleurisy, and septicemia. For implementation of strategies to control and prevent infections, it is necessary to know about the profile of agent spread in natural conditions and in different types of production system. Given the lack of standardized serological techniques for this purpose, this study aims to evaluate the influence of different methods and sites of sample collection in the detection of animals with *P. multocida* by polymerase chain reaction (PCR) and ELISA. We evaluated different pairs of primers specific for the agent and the reaction that have lower detection threshold will be used in the evaluation of the study sites. Swabs were collected from the nasal cavity, tonsil and also blood of 90 animals. Among these, 14 (15.55%) were positive for *Pasteurella multocida* by polymerase chain reaction (PCR), all of which were nasal swabs. There are no positive animals among the tonsil swabs. In the ELISA, 25 (27.77%) were positive, and of these, three (3.33%) were positive in both the polymerase chain reaction and the ELISA and the remaining 22 (24.44%) was positive by ELISA and negative by polymerase chain reaction. Using comparison of proportion analysis, was observed a significant differences in the methodology of diagnosis in different tests considering p-value <0.0001 and a confidence interval of 95%. Concluding, the frequency of positives was significantly higher in ELISA than by the polymerase chain reaction.

Key words: *Pasteurella multocida*. Swine. PCR. ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	“ <i>Pasteurella multocida</i> Antibody Test Kit - Flock chek”, produzido pelo laboratório IDEXX (Westbrook, Maine, USA), acrescido do conjugado anti-suíno marcado com peroxidase	30
Figura 2 -	Placas de ELISA contendo os soros em teste, pronta para a leitura das densidades ópticas	30
Figura 3 -	Tonsila palatina do suíno em animal submetido à necropsia	30
Figura 4 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. - Coluna 1- Amostra padrão de <i>P. multocida</i> tipo A, Coluna 2- Amostra padrão de <i>P. multocida</i> tipo D, Coluna 3- controle negativo, Coluna 4- marcador de pares de base 100 bp DNA Ladder.	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Metodologias para detecção de <i>Pasteurella multocida</i>	22
Quadro 2 - Seqüência de primers testados para detecção de P. multocida	28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Tabela de contingência demonstrando os resultados obtidos através do teste de ELISA indireto e do PCR 32
- Tabela 2 - Número e frequência de animais positivos para *Pasteurella multocida* através do ELISA e da reação em cadeia pela polimerase de acordo com o local examinado (cavidade nasal e tonsila) 33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE	16
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	17
2.2.1	Toxinas	17
2.2.2	Proteínas externas de membrana (OMPs)	18
2.2.3	Enzimas	19
2.2.4	Fímbrias	20
2.2.5	Cápsula	20
2.3	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>P. multocida</i>	21
2.4	USO DA PCR NO DIAGNÓSTICO	22
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	MATERIAL	25
4.2	COLETA DE AMOSTRAS	25
4.3	DETECÇÃO DO AGENTE ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	26
4.3.1	Determinação do limiar de detecção	26
4.3.2	Extração do DNA bacteriano	26
4.3.3	Amplificação do DNA	27
4.3.4	Detecção do produto de amplificação	28
4.4	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DO ELISA	28
4.5	TRATAMENTO DOS DADOS	29
5	RESULTADOS	31
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias estão entre as maiores causas de prejuízo para a indústria suinícola, seja pelo retardo no crescimento e ganho de peso, mortalidade de animais ou pelos gastos com vacinas, medicamentos e assistência veterinária. A *P. multocida* é o agente causador da rinite atrófica progressiva (RAP) dos suínos e está envolvida em casos de pneumonia, pleurite e eventualmente em casos de septicemia. No Brasil a rinite atrófica e as pneumonias causadas pela *P. multocida* subsp. *multocida* são muito freqüentes, e estudos voltados para a epidemiologia e distribuição deste agente são escassos. A utilização de vacinas para o controle da rinite atrófica progressiva tem sido de grande auxílio na redução do impacto desta infecção nas criações de suínos, no entanto, pouco se sabe sobre o comportamento do agente e sobre o perfil de eliminação do mesmo no que se refere aos quadros de pneumonia. Não existem até o momento, testes sorológicos padronizados para identificação de anticorpos contra o agente em suínos. O conhecimento sobre os momentos de disseminação desta bactéria e sobre os picos de infecção permitirão a utilização racional dos antibióticos voltados para o tratamento das infecções respiratórias, no entanto, estudos iniciais têm indicado uma baixa detecção do agente através da PCR em suabes de tonsila. Este fato pode estar relacionado a problemas na reação empregada ou baixa concentração do agente na amostra clínica. Com a finalidade de verificar os melhores meios para detecção de suínos portadores é proposta no presente estudo a avaliação de diferentes reações e diferentes sítios de coleta das amostras clínicas e a avaliação e adaptação de um teste ELISA comercial destinado para detecção de anticorpos contra *P. multocida* em aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diversas espécies do gênero *Pasteurella* têm sido descritas e caracterizadas, dentre elas a *Pasteurella multocida* tem se destacado por sua importância como patógeno em animais domésticos e eventualmente em humanos (CONFER, 1993; HATFALUDI et al., 2010). Esta espécie apresenta alta diversidade e complexidade em relação à variação antigênica, hospedeiros e patogênese. Alguns tipos capsulares são agentes etiológicos de pasteureloses severas como a cólera aviária que afeta aves domésticas e silvestres, a septicemia hemorrágica bovina, e a rinite atrófica progressiva em suínos (HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000; HATFALUDI et al., 2010; BOYCE et al., 2010).

A infecção humana foi inicialmente descrita como decorrência de mordidas por animais domésticos infectados, no entanto amostras toxigênicas de *P. multocida* têm sido isoladas de humanos com amigdalite, sinusite, rinite, pleurite, apendicite e septicemia, reforçando o potencial zoonótico do agente (NIELSEN; FREDERIKSEN, 1990; TURNQUIST, 1995).

Em suínos a *P. multocida* é um dos agentes etiológicos da rinite atrófica progressiva, está frequentemente envolvida em casos de pneumonia e alguns sorotipos podem causar septicemia (TOWNSEND et al., 1998; TOWNSEND, 2000; PIJOAN, 2006; HUNT; ADLER;; HATFALUDI et al., 2010; BOYCE et al., 2010).

A doença do trato respiratório superior, denominada rinite atrófica progressiva (RAP) é causada pela infecção por amostras toxigênicas de *P. multocida* associadas ou não a infecção por *Bordetella bronchiseptica* e fatores ambientais. A lesão característica da RAP consiste de hipoplasia dos ossos turbinados nasais, sendo em casos graves acompanhada por diferentes graus de distorção facial e hemorragia nasal (DE JONG, 2006).

A pneumonia por *P. multocida* ocorre frequentemente em associação à infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* causando o que Pijoan (1999) Sorensen et al. (2006) denominam complexo das doenças respiratórias dos suínos. Esta síndrome é uma das mais comuns em suínos e causa os maiores prejuízos à suinocultura, principalmente em animais criados em confinamento (FLABET et al., In press). Nos casos de pasteurelose pulmonar descreve-se a ocorrência de uma forma

subaguda e uma forma crônica (PIJOAN, 2006; SORENSEN; JORSAL; MOUSING, 2006).

A forma subaguda está associada a amostras capazes de causar pleurite. Nestes casos tosse e respiração abdominal podem ser observadas em animais das fases de crescimento e terminação. Os sinais clínicos desta forma são similares aos observados na pleuropneumonia causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. A forma crônica é a mais comum e se caracteriza por tosse, batedeira e inexistência de febre. Os animais afetados têm em média 10 a 16 semanas de idade e os sintomas são indistinguíveis da pneumonia enzoótica (PIJOAN, 2006).

Os casos agudos de septicemia por *P. multocida* estão geralmente associados a amostras do tipo capsular B sorotipo somático 2 (B:2). Esta forma de infecção é considerada rara e nunca foi descrita na América ou na Europa, sendo relatada na Índia, Sri Lanka e Vietnã (VERMA, 1988; GAMAGE et al., 1995; TOWNSEND et al., 1998). Os animais infectados por este sorotipo apresentam dispnéia, respiração difícil, contrações abdominais, prostração e febre alta. Animais mortos ou muito doentes podem apresentar coloração arroxeada na região abdominal sugerindo a ocorrência de choque endotóxico (PIJOAN, 2006).

Para muitos dos microrganismos envolvidos nas doenças respiratórias a transmissão vertical é suspeita de ocorrer em rebanhos infectados endemicamente durante a fase de aleitamento (ZIMMERMAN et al., 2006). As porcas, portanto, podem servir como um reservatório para a contínua circulação de agentes infecciosos, especialmente em criações de ciclo completo, onde ambas as populações, isto é, o rebanho de reprodução e os suínos em crescimento e em terminação, são criados no mesmo local (CALSAMIGLIA; PIJOAN, 2000; SORENSEN; JORSAL; MOUSING, 2006).

A epidemiologia da infecção por *P. multocida* ainda não está bem esclarecida. O microrganismo está presente em praticamente todas as criações de suínos e pode ser isolado da cavidade nasal e tonsila de animais saudáveis. A transmissão do agente pode ser horizontal, através de aerossóis e do contato direto entre os suínos, ou vertical. As fontes externas do agente incluem camundongos e outros roedores assim como aves silvestres e domésticas (PIJOAN, 2006). No caso das amostras de *P. multocida* toxigênica a prevalência de plantéis contaminados varia de um país para outro. Neste caso a introdução de animais portadores do agente parece ser a forma mais importante de disseminação da RAP. Em granjas contaminadas por

amostras toxigênicas a transmissão vertical, da fêmea para o leitão, ocorre na primeira semana de vida e tem grande importância na perpetuação da doença (DE JONG, 2006).

2.1 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

A *P. multocida* pertence à família *Pasteurellaceae* Pohl 1981 que engloba os gêneros *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus* e diversos outros com maior ou menor semelhança fenotípica e genotípica (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

O primeiro isolamento de uma bactéria do gênero *Pasteurella* ocorreu entre 1880 e 1881, sendo o nome *Pasteurella*, dado em homenagem a Louis Pasteur, que em 1887 isolou o agente em casos de cólera aviária de perus (MUTTERS; MANNHEIM; BISGAARD, 1989; HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000).

A *P. multocida* é uma espécie heterogênea subdividida em quatro subespécies de acordo com os padrões de fermentação de carboidratos (BOYCE et al., 2010). A *P. multocida* subsp. *multocida* que inclui a maior parte das amostras que causam infecção em humanos, bovinos, suínos, aves domésticas e gatos, a *P. multocida* subsp. *septica* tem sido isolada em felinos e aves silvestres e a *P. multocida* subsp. *gallicida* tem sido descrita em aves e suínos (BLACKALL; PAHOFF; POWLES, 1997) e a *P. multocida* subsp. *tigris* isoladas de lesões de mordedura de grandes felinos (CHRISTENSEN et al., 2005).

O agente é um cocobacilo ou bacilo curto com largura de 0,3 a 1 μm e comprimento variando de 1 a 2 μm . Trata-se de uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, imóvel, não hemolítica, produtora de indol, catalase e oxidase positivas e urease negativa. Em esfregaços frescos corados pelas técnicas de Giemsa ou Wrigth o organismo apresenta coloração bipolar (MUTTERS; MANNHEIM; BISGAARD, 1989).

A superfície da célula protege as bactérias Gram-negativas contra uma gama de ambientes hostis e é fundamental para interação da bactéria com o hospedeiro. Cepas virulentas de *P. multocida* produzem uma cápsula de polissacarídeo. A espécie *P. multocida* apresenta cinco tipos capsulares, A, B, D, E e F, dos quais A, D e B já foram descritos em suínos. A cápsula do tipo capsular A contém ácido

hialurônico, enquanto que nos tipos capsulares D e F as cápsulas contêm heparina e condroitina, respectivamente (HATFALUDI et al., 2010). O tipo mais freqüente em casos de pneumonia é o A, no entanto uma percentagem variável de isolados do tipo D também tem sido observada (PIJOAN; MORRISON; HILLEY, 1983). Em casos de RAP observa-se uma maior freqüência de isolados do tipo D produtores de toxina, mas amostras do tipo A também podem estar presentes na cavidade nasal e podem ser positivas para produção de toxina. A maior prevalência de amostras de tipo D ou de tipo A toxigênicas parece variar de um país para outro (PIJOAN; MORRISON; HILLEY, 1983; IWAMATSU; SAWADA, 1988).

Além da classificação baseada nos componentes capsulares as amostras de *P. multocida* podem ser classificadas de acordo com os antígenos somáticos. Até o momento foram identificados 16 sorotipos somáticos, sendo os sorotipos 3 e 5 os mais freqüentes em suínos (PIJOAN, 2006, HATFALUDI et al., 2010).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

2.2.1 Toxinas

Algumas amostras de *P. multocida* são capazes de produzir uma toxina protéica de 145 kDa, também conhecida como toxina dermonecrótica ou proteína ToxA (LICHTENSTEIGER et al., 1996). A toxina é termolábil, dermonecrótica em cobaio e letal para camundongos quando administrada pela via intraperitoneal (DE JONG, 1980; DE JONG, 2006).

A toxina produzida pela *P. multocida* tem a habilidade de alterar a morfogênese de um tecido ou órgão. No caso da RAP este processo se dá nos ossos turbinados nasais. As alterações nos ossos turbinados incluem um aumento no número de osteoclastos e uma progressiva degeneração dos osteoblastos (PEDERSEN; ELLING, 1984). Estes tipos celulares juntos são responsáveis pelo processo de formação e remodelamento dos ossos. Os osteoblastos produzem as camadas de tecido ósseo e controlam a atividade dos osteoclastos. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, necessária para o

remodelamento e crescimento ósseo. A toxina altera o equilíbrio entre a produção e reabsorção de tecido ósseo em favor da reabsorção. Como consequência o osso desaparece e eventualmente é substituído por células mesenquimais proliferadas (CHANTER, 1990).

Estudos com diferentes linhagens de cultivos celulares mostraram que a toxina é um dos mais potentes fatores de crescimento conhecidos, sendo capaz de ligar-se à célula, penetrar na mesma, alterar o metabolismo lipídico e ativar mecanismos de crescimento e divisão celular (CHANTER, 1990).

Não foi possível estabelecer a importância da toxina na patogenia das infecções pulmonares por *P. multocida*, embora alguns autores descrevam o isolamento de amostras toxigênicas a partir de pulmões de suínos (PIJOAN et al., 1984; IWAMATSU; SAWADA, 1988).

Amostras toxigênicas de *P. multocida* também são descritas causando doença em outras espécies como coelhos, caprinos, ovinos, aves, e bovinos. Aves, bovinos, ovinos assim como ratos, cães e gatos são considerados carreadores do agente (AVRIL; DONNIO; POUEDRAS, 1990; DE JONG, 2006).

2.2.2 Proteínas externas de membrana (OMPs)

O interesse crescente nas OMPs é devido a suas propriedades imunogênicas, o que faz destas proteínas candidatas potenciais a produção de vacinas (LU et al., 1991). No entanto, algumas destas proteínas também atuam diretamente como fatores de virulência (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

A necessidade de ferro e a capacidade de adquiri-lo *in vivo* têm sido descrita em diversas espécies, sendo os sistemas de captação de ferro considerados fatores de virulência (LEE et al., 1991). Proteínas externas de membrana de alto peso molecular têm sido especuladas como possíveis responsáveis pela captação de ferro em amostras de *P. multocida*, devido a sua expressão em meios de cultura com quantidades limitadas de ferro (ZHAO et al., 1995). A produção de quelantes de ferro de baixo peso molecular, semelhantes à sideróforos também tem sido cogitada (HU et al., 1986).

As OMPs de *P. multocida* também podem estar envolvidas na adesão à células alvo. Uma proteína de 35 kDa presente na cápsula de uma amostra de origem bovina do tipo A foi descrita como um possível fator de adesão. Anticorpos específicos contra esta proteína inibiram significativamente a adesão das OMPs a preparados de mucosa respiratória (LÜBKE et al., 1994).

Truscott e Hirsh (1988) observaram uma OMP com atividade antifagocítica em uma amostra de *P. multocida* aviária. Perus que receberam anticorpos específicos contra esta proteína de 50 kDa foram protegidos quando desafiados com uma amostra virulenta de *P. multocida*.

2.2.3 Enzimas

Uma das enzimas mais estudadas em amostras de *P. multocida* é a neuraminidase. Apesar de esta enzima ser descrita em diferentes espécies de *Pasteurella* e outras espécies de bactérias, o papel desta enzima na virulência das amostras permanece obscuro (RIMLER; RHOADES, 1989). Com base em diversas investigações descobriu-se que todos os tipos capsulares e somáticos de *P. multocida*, com exceção do tipo capsular F, produzem uma neuraminidase que difere da produzida por outros microrganismos por apresentar alto peso molecular (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

A neuraminidase atua removendo o ácido siálico de glicoproteínas e glicolípídeos. Sugere-se que o efeito protetor de glicoproteínas salivares contra eventuais patógenos seja reduzido na presença de moléculas de neuraminidase. O mesmo efeito inibitório tem sido descrito para glicoproteínas séricas (principalmente transferrinas) de humanos, coelhos e bovinos (RIMLER; RHOADES, 1989). A relevância destes modelos para neuraminidase na patogenia da cólera aviária ou nas infecções em suínos permanece incerta (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

Outras enzimas têm sido descritas em amostras de *P. multocida*, mas sua importância na virulência do agente não é conhecida, dentre elas está a hialuronidase, a fosfatase alcalina, a esterase, a lipase, a leucina aminopeptidase, a fosfatase ácida, e a fosfohidrolase (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

2.2.4 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; ANDERSON; CAMPBELL, 1966; BOROWISKI, 2001).

O papel das fímbrias na virulência de diversas espécies é amplamente documentado. O isolamento de amostras fimbriadas de *P. multocida* tipo A e tipo D têm sido descritas por diferentes autores em aves, suínos e coelhos (GLORIOSO; JONES; RUSH, 1982; PIFFER; CASTRO, 1993; TRIGO; PIJOAN, 1988). No entanto, maiores estudos sobre este tema têm sido dificultados pela influência de diferentes fatores tais como temperatura de incubação, repetidos sub-cultivos e meios de cultura utilizados na expressão *in vitro* das fímbrias (GLORIOSO; JONES; RUSH, 1982).

2.2.5 Cápsula

A maioria das amostras de *P. multocida* possui uma cápsula similar à observada na superfície celular de várias espécies bacterianas. Esta cápsula é composta por polissacarídeos polianiônicos altamente hidratados, os quais são ligados covalentemente à superfície celular por moléculas de lipídio A (ROBERTS, 1996). Polissacarídeos são compostos por repetições de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e formam um grupo muito diverso. Esta diversidade dos polissacarídeos capsulares é de significativa importância na patogênese das doenças sistêmicas (MOXON; KROLL, 1990).

Mutantes acapsulares de uma série de microrganismos apresentam virulência reduzida (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). A cápsula de *P. multocida* tem sido relacionada à virulência, pois amostras com cápsula apresentam maior resistência à fagocitose e ao efeito bactericida do complemento (SNIPES; GHAZIKHANIAN; HIRSH, 1986).

2.3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *P. multocida*

Desde o primeiro isolamento em 1881, a detecção, a identificação e a caracterização de *P. multocida* limitou-se a habilidade de cultivar e purificar o microrganismo em laboratório. O agente isolado era então classificado de acordo com suas características fenotípicas, como morfologia, padrão de fermentação de carboidratos, e propriedades sorológicas (MATSUMOTO; STRAIN, 1993).

A utilização da PCR na caracterização de amostras de *P. multocida* foi descrita inicialmente em 1994 quando *primers* específicos para sequência codificadora da proteína ToxA ou toxina dermonecrótica foram desenvolvidos por Nagai, Someno e Yagihashi (1994). Subseqüentemente, outros testes baseados na PCR foram descritos para detecção de amostras toxigênicas de *P. multocida* (KAMP et al., 1996, LICHTENSTEIGER et al., 1996). Dentre as reações descritas, a desenvolvida por Kamp et al. (1996) parece ser a mais sensível e efetiva para análise em larga escala de suabs nasais e de tonsila (HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000).

Para identificação de amostras de *P. multocida* foram descritas até o momento cinco metodologias utilizando a PCR (Quadro 1). Dentre os diferentes métodos descritos dois estudos apresentam reações com potencial de uso para detecção do agente em suínos (LIU; LAWRENCE; AUSTIN, 2004, TOWNSEND et al., 1998).

Além da identificação do gênero e espécie foi desenvolvido partir da identificação de uma região no genoma bacteriano específica para amostras do tipo capsular B e posteriormente para o tipo A, uma reação sob a forma de Multiplex (M-PCR) capaz de diferenciar as amostras de *P. multocida* que apresentam os diferentes tipos capsulares: A, B, D, E e F (TOWNSEND et al., 2001).

Gene Alvo	População Alvo	Referência
tRNA-intergenic spacer	Todos os sorotipos	CATRY et al. (2004)
23S rRNA	Todos os sorotipos	MIFLIN; BLACKALL (2001)
<i>Pm0762</i> e <i>Pm1231</i>	Todos os sorotipos	LIU et al. (2004)
Desconhecido	Todos os sorotipos	TOWNSEND et al. (1998)
Adenilato ciclase	Tipo capsular B	ESCANDE; CRASNIER (1993)

Quadro 1 - Metodologias para detecção de *Pasteurella multocida*

2.4 USO DA PCR NO DIAGNÓSTICO

Além da caracterização de isolados de *P. multocida*, a PCR para gênero e espécie pode ser empregada na identificação de animais portadores. Em suínos a avaliação do perfil de eliminação de agentes patogênicos pelos animais portadores tem sido bastante empregada na monitoria sanitária dos plantéis. A partir da identificação dos picos de eliminação dos agentes respiratórios e entéricos são determinados os melhores momentos para vacinação ou administração de antibióticos, reduzindo assim os gastos com intervenções excessivas e o uso indiscriminado de antimicrobianos (SOBESTIANSKY et al, 2005).

Em relação às doenças respiratórias, a detecção de animais portadores de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis* tem sido realizada com sucesso a partir de suabes de tonsila, no entanto, a detecção de *Pasteurella multocida* empregando a reação descrita por Townsend et al., (1998) tem resultado em menos de 1% de animais positivos.

Tendo em vista a ampla distribuição deste agente e a alta frequência de isolamento do mesmo a partir de casos de pneumonia, imagina-se que esteja havendo alguma falha na detecção desta bactéria nestes casos. Esta falha pode estar relacionada ao alto uso de antimicrobianos nos rebanhos examinados, baixo limiar de detecção da reação empregada ou baixa concentração do agente no suabe de tonsila. O isolamento do agente a partir de tonsilas é amplamente descrito na literatura (JAMALUDIN et al., 2005).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o limiar de detecção de diferentes *primers* específicos para detecção de *Pasteurella multocida* (gênero e espécie), selecionar o par de *primers* que apresentar menor limiar de detecção aplicando o mesmo na comparação entre os sítios e métodos de coleta de amostras. Comparar os resultados da PCR entre os diferentes sítios de coleta e também em relação ao teste sorológico.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAL

Foram avaliados 90 suínos em idade de abate, constituindo dois grupos originados de duas propriedades diferentes. Os animais foram examinados antes do abate e após o abate antes da escalda. As amostras foram coletadas em um abatedouro com inspeção estadual, localizado no município de Carapicuíba.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas as seguintes amostras pareadas dos 90 animais:

- Suabe da cavidade nasal (baia de espera)
- Suabe de tonsila (baia de espera)
- Sangue (após o abate)

Os suabes nasais e de tonsila (Figura 3) foram coletados em dois dias diferentes na baia de espera do abatedouro e foram transportados ao laboratório sob refrigeração em embalagem plástica individual.

O sangue foi coletado nestas mesmas visitas no momento da sangria, após o eletrochoque e antes da escalda, em tubos Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ / USA) estéreis e sem anticoagulantes.

4.3 DETECÇÃO DO AGENTE ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

4.3.1 Determinação do limiar de detecção

Para o estabelecimento do limiar de detecção dos *primers* seleccionados foi utilizada a cepa padrão de *Pasteurella multocida* tipo A cedida pelo Centro Nacional de Suínos e Aves (CNPSA)- Concórdia, SC.

A cepa foi semeada em BHI a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 1,0 ml foi adicionada a 9,0 ml de solução salina fosfatada, sendo realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} . De cada diluição foram imediatamente separadas duas alíquotas de 200 µl cada, sendo uma congelada para extração de DNA e outra semeada em placa de ágar sangue de carneiro, incubada a 37°C por 24 horas, para contagem de unidades formadoras de colônias.

4.3.2 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano a partir dos suabes nasais e de tonsila foi realizada segundo o método descrito por Boom et al. (1990).

A purificação de ácidos nucleicos foi procedida segundo protocolo descrito por Boom et al. (1990), com algumas modificações.

Um microtubo contendo 200 µL do cultivo de *P. multocida* em infusão cérebro-coração (Difco-BBL, Detroit, MI /USA) ou suabes nasais/ tonsila foram adicionados ao microtubo 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 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 primeira 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 ressuspenso 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.

4.3.3 Amplificação do DNA

A PCR para detecção do agente em amostras de suabes nasais e de tonsila foi realizada em microplacas de 96 cavidades. Para tanto uma alíquota de 5 µl de DNA de cada amostra foi adicionada na cavidade correspondente, seguindo o desenho pré determinado para cada ensaio. Cada grupo experimental foi testado em uma microplaca de PCR contendo 90 amostras de DNA dos animais testados e 3 controles positivos (DNA bacteriano) e 3 controles negativos (água milliQ®).

A detecção de *P. multocida* foi realizada utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase que apresentou o menor limiar de detecção. Foram testados o pares de primers descritos no quadro 2. Estes primers foram escolhidos por apresentarem maior especificidade segundo a literatura consultada (ESCANDE; CRASNIER, 1993; MIFLIN; BLACKALL , 2001; CATRY et al. 2004).

Primer	Seqüência (5´-3´)	Produto (pb)	Autores
Pm0762 -F Pm0762 -R	TTGTGCAGTTCCGCAAATAA TTCACCTGCAACAGCAAGAC	567	LIU; LAWRENCE; AUSTIN, 2004
Pm1231- F Pm1231- R	AGAAAGCACATGACCAAAGG GCAGCTACTCGCAGAAGGTT	601	LIU; LAWRENCE; AUSTIN, 2004
KMT1T7 KMT1SP6	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460	TOWSEND et al., 1998

Quadro 2 - Seqüência de *primers* testados para detecção de *P. multocida*

4.3.4 Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada através da eletroforese em gel de Agarose 1,5 %, utilizando-se 10 µl da amostra e 1 µl do corante Blue Green® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de pares de base 100 bp DNA Ladder (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil).

4.4 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DO ELISA

Foi utilizado o ELISA indireto “*Pasteurella multocida* Antibody Test Kit - Flock chek” (IDEXX Laboratories - Westbrook, Maine, USA, lote: 09251JD-JD703) (Figura 1), dirigido a detecção de anticorpos contra *P. multocida* em aves. Para o emprego da prova em suínos o anticorpo espécie específico conjugado a peroxidase do Kit foi substituído por um conjugado Anti-IgG suína.

Para o emprego da prova em suínos o anticorpo espécie específico conjugado a peroxidase do Kit foi substituído por um conjugado Anti-IgG suína.

O conjugado utilizado neste caso foi o proveniente do Kit para detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit IDEXX Laboratories - Westbrook, Maine, USA- lote: 06733DD116). Como controle positivo de origem suína foi obtido a partir do soro de dois animais de aproximadamente 90

dias com pneumonia por *Pasteurella multocida* examinado no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia e confirmada através de isolamento bacteriano e PCR.

Após o teste as microplacas (Figura 2) foram colocadas em espectrofotômetro de placa (leitora de ELISA) com filtro de 650 nm e os resultados registrados em valores de absorbância (Densidade óptica - DO). Os valores de densidade óptica foram lançados no programa X-Chek™ 3.3 (IDEXX Laboratories - Westbrook, Maine, USA) na modalidade específica para o teste de *P. multocida* e convertidos em títulos de anticorpos.

Devido a semelhança das densidades ópticas observadas nos controles positivos de suínos e aves optou-se neste primeiro teste pela utilização dos mesmos valores de ponto de corte (*cut off*) preconizados pelo fabricante para espécie aviária. Portanto, foram considerados positivos títulos de anticorpos superiores a 396, o que corresponde a uma relação S/P > 0,2. A fórmula utilizada para o cálculo da relação S/P e do título é descrita abaixo:

$$\text{Relação S/P} = \frac{\text{DO amostra} - \text{Média DO dos negativos}}{\text{Média DO positivos} - \text{Média DO negativos}}$$

4.5 TRATAMENTO DOS DADOS

Para se conhecer o melhor método de coleta e avaliar os testes diagnósticos para a detecção de *P. multocida* foram comparadas as proporções de positivos no PCR para cada sítio e comparadas as proporções de positivos na PCR e no ELISA. Foram calculadas as sensibilidades relativas e respectivos intervalos de confiança (IC=95%) da PCR para cada sítio e para cada teste através da análise de comparação de proporções.

Figura 1 - “*Pasteurella multocida* Antibody Test Kit - Flockchek”, produzido pelo laboratório IDEXX (Westbrook, Maine, USA), acrescido do conjugado anti-suíno marcado com peroxidase

Figura 2 - Placas de ELISA contendo os soros em teste, pronta para a leitura das densidades ópticas

Figura 3 - Tonsila palatina do suíno em animal submetido à necropsia

5 RESULTADOS

Foi realizada a determinação do limiar de detecção da PCR para detecção de *Pasteurella multocida* (Figura 4) com os três pares de primers descritos no quadro 1, sendo que as três reações apresentaram o mesmo limiar de detecção de 10^3 UFC/ml. A partir deste resultado optou-se por fazer as avaliações com os primers descritos por Townsend et al., (1998).

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%. - Coluna 1- Amostra padrão de *P. multocida* tipo A, Coluna 2- Amostra padrão de *P. multocida* tipo D, Coluna 3- controle negativo, Coluna 4- marcador de pares de base 100 bp DNA Ladder.

Dentre os 90 animais avaliados, 14 (15,55%) foram positivos para detecção de *Pasteurella multocida* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), sendo que todos estes foram obtidos em suabes nasais. Através da avaliação dos suabes de tonsila não se observou nenhum animal positivo. A análise de comparação de proporção indicou diferença significativa em relação à presença do agente nos diferentes sítios de coleta considerando-se valor de $p < 0,0001$ e intervalo de confiança de 95%. Ou seja, a frequência de positivos foi significativamente maior em amostras de suabe nasal que em suabe de tonsila.

Já no teste de ELISA, dos 90 animais testados, 25 (27,77%) foram positivos, sendo que destes, 3 (3,33%) foram positivos tanto na reação em cadeia pela polimerase quanto no ELISA e o restante, 22 (24,44%), foi positivo no ELISA e negativo através da reação em cadeia pela polimerase. Ainda, 11 (12,22%) animais foram negativos no ELISA e positivos através da reação em cadeia pela polimerase. Estes dados podem ser observados através da tabela 1. Não houve associação entre os resultados do ELISA indireto e da PCR aplicada ao suabe nasal ($p=0,75$ pelo teste do qui-quadrado). Através da análise de comparação de proporção, houve diferença significativa em relação à metodologia de diagnóstico nos diferentes testes realizados considerando-se valor de $p < 0,0001$ e intervalo de confiança de 95%. Ou seja, a frequência de positivos foi significativamente maior no teste de ELISA que através da reação em cadeia pela polimerase.

A frequência de positivos nas amostras de suabes nasal, de tonsilas e através do ELISA é representada na tabela 2 e no gráfico 1.

Tabela 1 – Tabela de contingência demonstrando os resultados obtidos através do teste de ELISA indireto e do PCR

	PCR Positivo	PCR Negativo	Total
ELISA Positivo	3 (3,33%)	22 (24,44%)	25 (27,77%)
ELISA Negativo	11 (12,22%)	54 (60%)	65 (72,22%)
	14 (15,55%)	76 (84,44%)	90 (100%)

Tabela 2 – Número e frequência de animais positivos para *Pasteurella multocida* através do ELISA e da reação em cadeia pela polimerase de acordo com o local examinado (cavidade nasal e tonsila)

Teste realizado	Positivos	Negativos
	Número (%)	Número (%)
ELISA	25 (27,77%)	65 (72,23%)
PCR suabe nasal	14 (15,55%)	76 (84,45%)
PCR suabe de tonsila	0	90 (100%)

Gráfico 1 – Frequência de animais positivos para *Pasteurella multocida* através do ELISA e da reação em cadeia pela polimerase de acordo com o local examinado (cavidade nasal e tonsila)

6 DISCUSSÃO

Towsend et al. (2000) pesquisando a presença de *Pasteurella multocida* através de suabes de tonsilas de animais abatidos, utilizando os mesmos primers usados no presente estudo na técnica de PCR, detectaram 16 animais positivos em 36 amostras (44%). Este estudo é um dos únicos que relata a utilização da PCR para detecção direta do agente, no entanto o número de animais avaliados é bastante reduzido. No presente estudo, não foi detectada a presença de *P. multocida* em nenhum dos 90 suabes de tonsila estudados. Entretanto, a PCR foi positiva em 15,6% dos suabes de cavidade nasal.

A diferença encontrada nos sítios de coleta, suabe nasal e de tonsila era esperada, assim como descrito por Flabet et al. (In press), que avaliando marrãs em granjas de ciclo completo observaram uma maior probabilidade de encontrar animais positivos para *P. multocida* através da PCR de suabes da cavidade nasal, em relação aos suabes de tonsila. A presença, manutenção e multiplicação do agente na cavidade nasal podem ser favorecidas pela cobertura abundante de muco deste local. Tendo em vista que o limiar de detecção determinado para este agente através da PCR foi 10^3 UFC/ml, considerado alto para este tipo de teste, a hipótese destes animais terem se contaminado na baia de espera, imediatamente antes da coleta do suabe é pouco provável.

O fato do presente estudo não ter detectado nenhum positivo nos suabes de tonsila pode estar relacionado à baixa eliminação do agente no momento da coleta, ou à reduzida capacidade de adesão de cepas de *P. multocida*, e manutenção da mesma na superfície deste tecido, uma vez que os suabes foram feitos na superfície da tonsila, e não em fragmentos deste órgão. O suabe de tonsila é o material utilizado para detecção de outros agentes respiratórios na prática de diagnóstico, como *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*, já que coleta não é invasiva e é de fácil realização.

A sensibilidade da pcr em tonsila poderia ser aumentada se fosse examinado um fragmento ao invés de um suabe de superfície do órgão, no entanto a grande quantidade de tecido conjuntivo e DNA de células do hospedeiro neste tipo de amostra são freqüentemente citadas como inibidores para a reação da PCR. Lowe et al. (In press) avaliou 8 animais sem histórico de doenças respiratórias e

determinou que a *P. multocida* é um agente que faz parte da microbiota da tonsila de suínos saudáveis e foi encontrada através de exame bacteriológico de fragmentos de tonsila em mais de 50 % dos animais avaliados.

Tratando-se da *P. multocida*, um habitante normal da cavidade nasal dos suínos (PIJOAN, 2006; DE JONG, 2006), mesmo sendo descrito como agente primário em pneumonias na mesma espécie (KICH et al., 2007), esperava-se obter frequências maiores de animais eliminado o agente, principalmente nas amostras acima dos 110 dias de idade, ou seja, próximo a idade de abate, dada a comum associação deste agente com infecções por *M. hyopneumoniae* (PIJOAN, 2006; BOROWSKY, 2006; ROSS, 2007).

Não há estudos envolvendo a pesquisa de anticorpos contra *P. multocida* em suínos. Os testes ELISA com esta finalidade têm sido mais usados para detecção do agente em galinhas e perus, sendo descritos também testes para coelhos e bovinos.

Embora não tenha sido utilizado um gold standard, os resultados do presente estudo sugerem que o ELISA "*Pasteurella multocida* Antibody Test kit- Flock chek", produzido pelo laboratório IDEXX (Westbrook, Maine, USA) pode ser empregado em estudos envolvendo a espécie suína, com a devida substituição do conjugado de ave pelo de suíno. Através deste teste foi possível detectar anticorpos contra o agente em 27,8% dos animais avaliados.

Como podemos ver na tabela 1, não há associação entre ELISA e PCR, e a diferença entre a frequência de positivos observados através da PCR e do ELISA indica que estes animais tiveram contato com a bactéria, mesmo que não estivessem eliminando a mesma na cavidade nasal no momento em que foi realizada a coleta. Em estudos envolvendo a pesquisa de anticorpos contra *M. Hyopneumoniae*, em animais infectados naturalmente, observa-se uma diferença de 2 a 4 semanas entre a detecção do agente através da PCR e a soroconversão (BACCARO et al., 2006). Os animais positivos no ELISA podem ter tido contato com a bactéria há algumas semanas, já tendo ocorrido a soroconversão e não estarem mais eliminando o agente em níveis detectáveis no momento da coleta. O mesmo acontece com os positivos no PCR, que não foram positivos no ELISA, que estão eliminando em níveis detectáveis pela PCR, mas ainda não houve soroconversão. Os animais analisados não eram vacinados contra *P. multocida*.

Segundo Pijoan (2006), o diagnóstico sorológico não tem se mostrado efetivo para a infecção por *P. multocida* e não existem kits comerciais disponíveis. Contudo,

os resultados obtidos através no presente estudo indicam que esta ferramenta pode sim, ser de grande interesse em estudos epidemiológicos envolvendo casos de pasteurelose pulmonar em suínos, uma vez que este agente tem assumido importância cada vez maior em rebanhos que apresentam infecções imunossupressoras como circovirose e Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos e Doença de Ayujesky.

Medicamentos antimicrobianos são administrados para a espécie suína como forma de prevenção de doenças específicas. Os princípios da profilaxia antimicrobiana são: a medicação deve ser dirigida contra patógenos específicos; a profilaxia deve ser usada somente após a eficácia ser estabelecida; a profilaxia deve ser de menor duração possível levando-se em conta a eficácia; a dose deve ser a mesma que a utilizada terapeuticamente e os efeitos adversos devem ser minimizados. Uma prática profilática bastante utilizada é a de "pulso de medicamento", segundo o qual um nível terapêutico de um medicamento específico é incluído na alimentação por um curto período de tempo para a prevenção de endemias, tais como enteropatia proliferativa e do complexo de doenças respiratórias, antes do início previsível dessas doenças no rebanho (FRIENDSHIP & PRESCOTT, 2006).

Portanto para o estabelecimento de um programa de medicação eficiente é necessário conhecer o perfil de eliminação do agente ou perfil de anticorpos contra o mesmo, para que os animais sejam tratados de maneira correta e na fase adequada, obtendo-se a resposta esperada com o mínimo impacto para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana ou para segurança do alimento produzido.

7 CONCLUSÕES

Concluindo, os resultados indicam que o suabe de superfície de tonsila tem desempenho inferior ao de cavidade nasal na detecção da *P. multocida* pela PCR. Além disso, o teste ELISA indireto parece ser promissor para o diagnóstico indireto da infecção por *P. multocida* em suínos e sugere-se ulteriores estudos com esse método envolvendo gold standards consistentes e número maior de amostras.

REFERÊNCIAS

AVRIL, J. L.; DONNIO, P. Y. O.; POUEDRAS, P. Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1438-1440, 1990.

BACCARO, M. R.; HIROSE, F.; UMEHARA, O.; GONÇALVE, L. C. B.; DOTO, D. S.; PAIXÃO, R.; SHINYA, L. T.; MORENO, A. M. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 526-531, 2006.

BLACKALL, P. J.; PAHOFF, J. L.; POWLES, R. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 335-360, 1997.

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 for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.459-453. 1990.

BOROWSKY, S. M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil controle. In: SIMPÓSIO UFRGS SOBRE MANEJO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. p. 63-71.

BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 153-160, 2000.

BOYCE, J.; HARPER, M.; WILKIE, I.; ADLER, B.; Pasteurella. In: PRESCOTT, J.F. (ed.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Blackwell Publishing, 2010.

CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. **Veterinary Record**, v. 146, p. 530–532, 2000.

CATRY, B.; BAELE, M.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. tRNA-intergenic spacer PCR for the identification of *Pasteurella* and *Mannheimia* spp. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 251-260, 2004.

CHANTER, N. Advances in atrophic rhinitis and toxigenic *Pasteurella multocida* research. **Pig News and Information**, v. 33, p. 503-506, 1990.

CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. **Avian Pathology**, v. 26, p. 461-483, 1997.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M.; ANGEN, O.; FREDERIKSEN, W.; OLSEN, J. E.; Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 259–270, 2005.

CONFER, A. W. Immunogens of *Pasteurella*. **Veterinary Microbiology**, v. 37, p. 353-368, 1993.

DE JONG, M. F. Some aspects of the study of atrophic rhinitis. **Tijdschr Diergeneesk**, v. 105, p. 711-714, 1980.

DE JONG, M. F. Progressive and non progressive atrophic rhinitis. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of Swine**. **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 577–602.

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.

ESCANDE, F.; CRASNIER, M. Detection of na adenylate cyclase gene in *Pasteurella* species. **Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology**, v. 279, p. 45-50, 1993.

FABLET, C.; MAROIS, C.; KUNTZ-SIMON, G.; ROSE, N.; DORENLOR, V.; EONO, F.; EVENO, E.; JOLLY, J. P.; LE DEVENDEC, L.; TOCQUEVILLE, V.; QUE'GUINER, S.; GORIN, S.; KOBISCH, M.; MADEC, F. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. **Veterinary Microbiology**. (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.005 (In press).

FRIENDSHIP, R. M.; PRESCOTT, J. F. Drug therapy and prophylaxis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 1131–1143.

GAMAGE, L.N.A.; WIJEWARDANA, T. G.; BASTIANSZ, H. L. G.; VIPULASIRI, A. A. An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. **Siri Lanka Veterinary Journal**, v. 42, p. 15-19, 1995.

GLORIOSO, J. C. ; JONES, G. W.; RUSH, H. G.; Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. **Infection and Immunity**, v. 35, p. 1105-1109, 1982.

HATFALUDI, T.; AL-HASANI, K.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 1–17, 2010.

HU, S. P.; FELICE, L. J.; SIVANANDAN, V.; MAHESWARAN, S. K. Siderophore production by *Pasteurella multocida*. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 804-810, 1986.

HUNT, M. L.; ADLER, B.; TOWNSEND, K. M. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v.72, p. 3-25, 2000.

IWAMATSU, S.; SAWADA, T. Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolates and pneumonic lesions of porcine lung. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 50, p.1200-1206, 1988.

JAMALUDIN, R.; BLACKALL, P. J.; HANSEN, M. F.; HUMPHREY, S.; STYLES, M. Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal** v. 53, p. 203-207, 2005.

KAMP, E. M.; BOKKEN, G. C. A. M.; VERMEULEN, T. M. M.; DE JONG, M. F.; BUYS, H. E. C. M. ; REEK, F. H.; SMITS, M. A. A specific and sensitive PCR assay for large scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.304-309, 1996.

KICH, J. D.; NOGUEIRA, M.; MORES, N.; LOCATELLI, C.; TRIQUES, N. J.; KLEIN, C.S.; FELICIO, R. P. *Pasteurella multocida* tipo A como agente primário? diagnóstico e reprodução experimental da doença. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13, 2007. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007.

LEE, M. D.; WOOLEY, R. E.; BROWN, J.; GLISSON, J. R. A survey of potential virulence markers from avian strains of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**. v. 26, p. 213-225, 1991.

LICHTENSTEIGER , C. A.; STEENBERGEN, S. M.; LEE, R. M.; POLSON, D. D.; VIMR, E. R. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 3035-3039, 1996.

LIU, D.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W. Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 263-267, 2004.

LOWE, B. A.; MARSH, T. L.; ISAACS-COSGROVE, N.; KIRKWOOD, R. N.; KIUPEL, M.; MULKS, M. H.; Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. **Veterinary Microbiology**. (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.025 (In press).

LU, Y. S.; GERRITY, L. W.; PAKES, S. P.; NIE, L. C. A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurellosis. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 172-180, 1991.

LUBKE, A.; HARTMANN, L.; SCHRODER, W.; HELLMANN, E. Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 281, p. 45-54, 1994.

MATSUMOTO, M.; STRAIN, J. G. Pathogenicity of *Pasteurella multocida*: its variable nature demonstrated by in vivo passages. **Avian Diseases**, v. 37, p. 781-785, 1993.

MIFLIN, J. K.; BLACKALL, P. J. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 216-221, 2001.

MOXON, E. R.; KROLL, J. S. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 150, p. 65-85, 1990.

MUTTERS, R.; MANNHEIM, W.; BISGAARD, M. Taxonomy of the group. In: ADLAN, C.; RUTTER, J.M. (Ed.). ***Pasteurella* and Pasteurellosis**. London: Academic Press Limited, 1989, p. 3-34.

NAGAI, S.; SOMENO, S.; YAGIHASHI, T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p. 1004-1010, 1994.

NIELSEN, J. P.; FREDERIKSEN, W. Atrophic rhinitis in pigs caused by a human isolate of toxigenic *Pasteurella multocida*. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 11, 1990. **Proceeding...** Pig Veterinary Society, 1990.

PEDERSEN, K. B.; ELLING, F. The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 94, p. 203-214, 1984.

PIFFER, I. A.; CASTRO, A. F. P. Capacidade hemaglutinante de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos e sua associação com fímbria e dermatotoxicidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 443-454, 1993.

PIJOAN, C.; MORRISON, R. B.; HILLEY, H. D. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, p. 1074-1076, 1983.

PIJOAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C.; LEMAN, A. D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 185, p. 522-523, 1984.

PIJOAN, C. Pneumonic pasteurelosis In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 719–726.

RIMLER, R. B.; RHOADES, K. R. *Pasteurella multocida*. In: ADLAM, C; RUTTER, J.M.(Eds.) **Pasteurella e Pasteurellosis**. London: Academic Press, 1989. p. 85-113.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 285-315, 1996.

ROSS, R. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, p. 13-29, 2007.

SNIPES, K. P.; GHAZIKHANIAN, G. Y.; HIRSH, D. C. Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. **Avian Diseases**, v. 31, p. 254-259, 1986.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORENO, A. M.; SOBESTIANSKY, A. A. B.; POLEZE, E. **Suínos: coleta e remessa de material para laboratórios para fins de diagnóstico**. Goiânia: SOBESTIANSKY, 2005. v.1. 122 p.

SORENSEN, V.; JORSAL, S. E.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 149–177.

TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; LEE, C. W.; PAPADIMITRIOU, J. M.; DAWKINS, H. J. S. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1096-1100, 1998.

TOWNSEND, K. M.; TRAN XUAN HANH; O'BOYLE, D.; WILKIE, I.; TO THI PHAN; WIJERWADANA, T. G.; NGUYEN TIEN TRUNG; FROST, A. J. PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 69-78, 2000.

TOWNSEND, K. M.; BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 924-929, 2001.

TRIGO, E.; PIJOAN, C. Presence of pili in *Pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. **Veterinary Record**, v. 122, p. 19, 1988.

TRUSCOTT, W. M.; HIRSH, D. C. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 1538-1544, 1988.

TURNQUIST, S. E. Etiology and diagnosis of progressive atrophic rhinitis. **Swine Health and Production**, v. 3, p. 168-170, 1995.

VERMA, N. D. *Pasteurella multocida* B:2 in haemorrhagic septicaemia outbreak in pigs in India. *Veterinary Record*, v. 123, p. 63, 1988.

ZHAO, G.; PIJOAN, C.; CHOI, K.; MAHESWARAN, K.; TRIGO, E. Expression of iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 46-50, 1995.

ZIMMERMAN, J.; BENFIELD, D.A.; MURTAUGH, M.P.; OSORIO, F.; STEVENSON, G.W.; TORREMORELL, M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine arterivirus). In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 387–418.