MAURICIO CABRAL DUTRA

**Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em
rinite na espécie suína**

**São Paulo
2009**

MAURICIO CABRAL DUTRA

**Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em
rinite na espécie suína**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andréa Micke Moreno

São Paulo
2009

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.2101
FMVZ

Dutra, Mauricio Cabral

Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em rinite na espécie suína / Mauricio Cabral Dutra. – São Paulo : M. C. Dutra, 2009.
64 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Micke Moreno.

1. Suíno. 2. Rinite. 3. PCR. 4. Cytomegalovírus. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em rinite na espécie suína”, protocolado sob o nº1550/2008, utilizando 756 suínos, 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 26 de novembro de 2008.

We certify that the Research “Elimination profile of infectious agents related with rhinitis in swine specie”, protocol number 1550/2008, utilizing 756 (seven hundred fifty six) swine, 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 11/26/08.

São Paulo, 27 de novembro de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DUTRA, Mauricio Cabral

Título: Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em rinite na espécie suína

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, pois ele está acima de todas as coisas.

À minha esposa Cláudia Cambria Dutra pelo amor, carinho e paciência.

Aos meus pais, Emanuel e Lídia Dutra, pelo amor, educação e pelas oportunidades.

À amiga Andréa Micke Moreno, pelo incentivo, confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa. Dra. Andréa Micke Moreno pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela confiança, pelo apoio e pela orientação sábia, precisa e determinada.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aperfeiçoar meus conhecimentos

Aos colegas da Suiaves, incluindo diretoria e toda equipe pela confiança, pelos anos de trabalho juntos e por permitirem a realização deste trabalho.

Aos colegas Wagner Loesch Vianna e Tânia Alen Coutinho pela ajuda e colaboração na realização desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Sanidade Suína, Débora Dirani Senna Gobbi, Marina Moreno, Renata Paixão, Sérgio Mello Teixeira Novita e Thaís S. Porfida Ferreira pelo apoio na realização do experimento e, sobretudo, pela amizade frutificada neste período.

Aos suinocultores, gerentes e funcionários das granjas, pela confiança ao emprestar seus animais para a realização do experimento, bem como pelo auxílio na sua execução.

À minha esposa Cláudia Cambria Dutra pelo seu amor, apoio nos momentos difíceis, pela sua ajuda e paciência na elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, Emanuel e Lídia Dutra, pelo seu amor incondicional e seu apoio em toda minha jornada.

Ao meu irmão Luiz Carlos Cabral Dutra pelo carinho, dedicação, amizade e amor sempre presente.

À Deus pelo dom da vida, pela minha família, amigos, minha saúde física e mental e a graça de viver cada dia, confiando somente no Senhor.

RESUMO

DUTRA, M. C. **Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em rinite na espécie suína.** [Elimination profile of infectious agents related with rhinitis in swine specie]. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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. Neste contexto os quadros de rinite têm apresentado uma contribuição significativa. O presente estudo propõe a determinação dos perfis de eliminação de agentes envolvidos em rinite nos suínos avaliando diferentes faixas etárias em nove propriedades de ciclo completo com histórico de lesão em cornetos e que utilizem diferentes formas de prevenção e controle destas manifestações. Foram avaliados suabes de tonsilas de 12 animais, nas seguintes faixas etárias: matrizes, leitões de 20, 40 e 60 dias, suínos de 90, 110 e 140 dias, totalizando 84 animais por propriedade e 756 amostras em todo o estudo. As amostras foram submetidas à pesquisa de *P. multocida* tipo capsular A e D, gene codificador de toxina dermonecrótica de *P. multocida*, *B. bronchiseptica* e cytomegalovirus suíno através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Apesar do histórico de lesões em corneto em todas as propriedades apenas um animal foi positivo para presença de *P. multocida* tipo A e todos foram negativos para a presença do gene codificador da toxina dermonecrótica. Dentre os 756 animais 22 (2,9%) foram positivos para presença de *B. bronchiseptica* e 198 (26,1%) para detecção cytomegalovirus suíno. A presença *B. bronchiseptica* apresentou associação estatisticamente significativa com as fases de maternidade e terminação. A maior frequência de cytomegalovirus suíno apresentou associação estatisticamente significativa com a fase de creche. Observaram-se matrizes eliminando *B. bronchiseptica* nos três tipos de granjas avaliadas, indicando que a fêmeas tem participação ativa na infecção dos leitões pelo agente. O mesmo não foi detectado na disseminação do cytomegalovirus suíno. Maiores estudos devem ser realizados para esclarecer a baixa eliminação de *P. multocida* e o verdadeiro impacto do cytomegalovirus nos rebanhos suínos.

Palavras-chave: Suíno. Rinite. PCR. Cytomegalovirus.

ABSTRACT

DUTRA, M. C. **Elimination profile of infectious agents related with rhinitis in swine specie.** [Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em rinite na espécie suína]. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Respiratory diseases are one of the largest cause of economic losses in swine industry, it is related with grown and weight gain reduction, mortality, vaccines and medicaments costs, veterinary assistance. In that context, rinithis cases have been a major contribution. The present study propose the determination of elimination profile of agents related with rhinitis evaluating different ages in nine swine herds with history of cornet lesions and that uses different ways to control and prevent this problem. There were examined tonsils swabs from 12 animals in the following ages: sows, piglets of 20, 40 60 days and pigs of 90, 110 and 140 days, totalizing 84 pigs for farm. The swabs were searched to *P. multocida* capsular type A and D, dermonecrotic toxin gene from *P. multocida*, *B. bronchiseptica* and porcine cytomegalovirus through polymerase chain reaction (PCR). Despite de turbinate bones lesions present in all herds *P. multocida* type A was detected in only one pig and none were positive to dermonecrotic toxin gene. From 756 animals, 22 (2.9%) were positive to *B. bronchiseptica* and 198 (26.1%) to porcine cytomegalovirus detection. The presence of *B. bronchiseptica* presented statistical association with the farrowing and finishing times. Larger number of animals positive to cytomegalovirus show statistical association with the post weaning pigs. Sows carrying *B. bronchiseptica* in the three types of herds examined, suggesting that sows have an active participation in piglet infection by this agent. The same was not observed in porcine cytomegalovirus spread. More projects were need to clarify the low detection of *P. multocida* and to understand the impact of cytomegalovirus in swine production.

Key word: Swine. Rhinitis. PCR. Cytomegalovirus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	PASTEURELLA MULTOCIDA	13
2.1.1	Características do agente	15
2.1.2	Fatores de Virulência	16
2.1.2.1	Toxinas	16
2.1.2.2	Proteínas externas de membrana	17
2.1.2.3	Enzimas	18
2.1.2.4	Fímbrias	19
2.1.2.5	Cápsula	19
2.1.3	Deteção e Caracterização molecular de <i>P. multocida</i>	20
2.2	BORDETELLA BRONCHISEPTICA	21
2.2.1	Características do agente	22
2.2.2	Diagnóstico da infecção por <i>B. bronchiseptica</i>	23
2.3	CYTOMEGALOVIRUS	24
2.3.1	Características do agente	25
2.3.2	Diagnóstico da infecção por PCMV	27
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Material	29
4.2	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	31
4.2.1	Extração do DNA bacteriano	31
4.2.2	Amplificação do DNA	32
4.2.3	Deteção de <i>P. multocida</i> e determinação do sorogrupo capsular..	32

4.2.4	Detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica	33
4.2.5	Detecção da <i>B. bronchiseptica</i> e Cytomegalovírus suíno.....	34
4.2.6	Determinação do limiar de detecção	35
4.2.7	Detecção do produto de amplificação	35
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	RESULTADOS	36
6	DISCUSSÃO	47
6.1	PASTEURELLA MULTOCIDA.....	47
6.2	BORDETELLA BRONCHISEPTICA	49
6.3	CYTOMEGALOVIRUS	52
7	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O sistema atual de produção de suínos confinando grandes quantidades de animais em pequenas áreas favorece a ocorrência de doenças, principalmente as do trato respiratório, com relevante importância econômica, (CHRISTENSEN et al., 1999; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007), seja pela interferência na conversão alimentar, na redução do ganho de peso diário, na mortalidade dos animais, ou mesmo com o aumento dos gastos com vacinas, medicamentos e assistência veterinária.

Dentre as principais doenças está a pneumonia enzoótica, causada pelo agente *Mycoplasma hyopneumoniae*, a pleuropneumonia oriunda da infecção pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae* e a rinite atrófica, causada pelos agentes bacterianos *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*, sendo este último envolvido também em casos de pneumonia, pleurite e eventualmente em casos de septicemia.

A rinite em suínos também pode ser viral, ocasionada pelo *Cytomegalovírus*, agente de ampla ocorrência mundial e importante em xenotransplantes (BRITO et al., 2007).

No Brasil, as rinites bacterianas e virais, bem como as pneumonias causadas pela *P. multocida* são muito freqüentes (KICH; PONTES, 2001; BOROWSKY et al., 2007), e estudos voltados para a epidemiologia e distribuição destes agentes são escassos.

Tratando-se de doenças multifatoriais, várias medidas sanitárias, como limpeza e desinfecção adequadas, correção de fatores de risco potenciais para o aparecimento da doença, auxiliam no seu controle, e a adoção de esquema adequado de vacinação é de extrema importância para um controle mais eficiente.

A utilização de vacinas para o controle da rinite atrófica tem sido de grande auxílio na redução do impacto desta infecção nas criações de suínos, porém, pouco se sabe sobre o comportamento do agente antes ou após a vacinação. Diferentes programas vacinais são propostos, incluindo apenas a vacinação da fêmea ou a vacinação da fêmea e leitões, no entanto, não têm sido conduzidos estudos avaliando o impacto destes protocolos sobre a circulação do agente no ambiente.

No presente estudo será avaliado o perfil de eliminação dos agentes causadores de rinite nos suínos, bem como sua interação em sistemas de produção com diferentes protocolos de vacinação contra rinite atrófica, além de diferentes características e histórico de infecção por estes agentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A estrutura de produção suína industrial tem mudado substancialmente nos últimos anos, com alojamento de grandes grupos de animais sob condições intensivas, frequentemente em regiões com densa população de suínos. Alta densidade de animais em ambientes fechados facilita a transmissão de patógenos de transmissão aerógena dentro dos rebanhos, bem como entre rebanhos (CHRISTENSEN et al., 1999).

Diante desta situação, as enfermidades respiratórias, bem como as doenças sistêmicas de transmissão aerógena são consideradas como um dos principais problemas sanitários na moderna produção suína (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

A rinite atrófica conhecida desde 1830, faz parte deste contexto. Inicialmente esta denominação englobava todas as rinites e doenças nas quais ocorriam alterações no focinho do suíno. Posteriormente, constatou-se tratar de uma doença específica, com alterações nos cornetos nasais, passando então a denominá-la rinite atrófica (BOROWSKY et al., 2007).

As principais rinites de origem infecciosa que acometem os suínos na atualidade são denominadas, de acordo com seu agente etiológico, em rinite atrófica progressiva, ocasionadas por cepas de *Pasteurella multocida* toxigênica associada à *Bordetella bronchiseptica*, rinite atrófica não progressiva, ocasionada apenas por cepas toxigênicas de *Bordetella bronchiseptica* e rinite por corpúsculo de inclusão, ocasionada pelo *Cytomegalovírus* (CHRISTENSEN et al., 1999).

Agentes não infecciosos como poeira e amônia, também podem ocasionar rinite nos suínos, ou mesmo agravar as rinites de origem infecciosa (HAMILTON et al., 1996; CHRISTENSEN et al., 1999).

2.1 PASTEURELLA MULTOCIDA

Várias espécies do gênero *Pasteurella* tem 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). A 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 et al., 2000).

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 (TURNQUIST, 1995; NIELSEN; FREDERIKSEN, 1990).

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 (TOWSEND et al., 1998; PIJOAN, 1999).

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, 2007).

A pneumonia por *P. multocida* ocorre frequentemente em associação à infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* causando o que Pijoan (1999) denomina 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. Nos casos de pasteurelose pulmonar descreve-se a ocorrência de uma forma subaguda e uma forma crônica (PIJOAN, 1999).

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.

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, 1999).

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, 1999). 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, 1999).

Para o controle da RAP, diferentes programas de vacinação têm sido propostos. Pejsak et al. (1994) avaliando treze programas de vacinação contra RAP, os quais envolviam vacinações somente das matrizes, somente de leitões ou matrizes e leitões com vacinas vivas e inativadas, obteve os melhores resultados

com redução de atrofia dos cornetos e melhor ganho de peso dos animais, vacinando as matrizes com vacina inativada oleosa aos 60 e 100 dias de gestação.

2.1.1 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 et al., 1989; HUNT et al., 2000).

A *P. multocida* é uma espécie heterogênea subdividida em três subespécies de acordo com os padrões de fermentação de carboidratos (MUTTERS et al., 1985). 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 et al., 1997).

O agente é um cocobacilo ou bacilo curto com largura de 0,5 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 et al., 1989).

A espécie *P. multocida* apresenta 5 tipos capsulares, A, B, D, E e F, dos quais A, D e B já foram descritos em suínos. 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 et al., 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 et al., 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, 1999).

2.1.2 Fatores de virulência

Os fatores de virulência, toxinas, proteínas externas de membrana (OMPs), enzimas, fímbrias e cápsulas são apresentados pelas cepas de *Pasteurella multocida* e serão apresentados a seguir.

2.1.2.1 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 2007).

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 sozinha de se ligar 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 et al., 1990; DE JONG, 2007).

2.1.2.2 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*.

2.1.2.3 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).

2.1.2.4 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 et al., 1966; BOROWSKI, 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 tem sido descritas por diferentes autores em aves, suínos e coelhos (GLORIOSO et al., 1982; TRIGO; PIJOAN, 1988; PIFFER; CASTRO, 1993). 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 et al., 1982).

2.1.2.5 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 et al., 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 et al., 1986).

2.1.3 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 purificado 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 et al. (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 suabes nasais e de tonsila (HUNT et al., 2000).

Para identificação de amostras de *P. multocida* foram descritas até o momento duas metodologias utilizando a PCR. Kasten et al. (1997), descreve a utilização de primers construídos para amplificar o gene *psl* de *P. multocida*, que codifica uma proteína similar a proteína P6 de *Haemophilus influenzae* e *H. parainfluenzae*. Townsend et al. (1998) desenvolveram uma PCR baseada na amplificação de uma sequência denominada KMT1 específica para o agente e identificada através de hibridização subtrativa.

A partir da identificação de uma região no genoma bacteriano específica para amostras do tipo capsular B e posteriormente para o tipo A, foi possível identificar outras regiões codificadoras de proteínas da cápsula e desenvolver uma reação sob a forma de Multiplex (M-PCR) capaz de diferenciar as amostras de *P. multocida* tipo capsular A, B, D, E e F (TOWNSEND et al., 2001).

2.2 BORDETELLA BRONCHISEPTICA

A *Bordetella bronchiseptica* tem distribuição mundial e está presente em quase todas as granjas de suínos, sendo suas cepas toxigênicas causadoras da rinite atrófica não-progressiva e da Bordetelose pulmonar (BOROWSKI et al., 2007).

B. bronchiseptica é primariamente introduzida em rebanhos livres de patógenos específicos, pelo ingresso de animais portadores e, em rebanhos contaminados, as matrizes são consideradas fontes de infecção para os leitões, infectando-os nas primeiras duas ou três semanas de idade, ou logo após o desmame (DE JONG, 2007).

A transmissão entre leitões ocorre por aerossol (BROCKMEIER; LAGER, 2002; HERMANN et al., 2008), bem como pelo contato direto entre os animais. A alta prevalência da infecção pela *B. bronchiseptica* em animais em crescimento sugere que a transmissão pode ocorrer em qualquer idade, sendo a idade de infecção importante no desenvolvimento das lesões, visto que as cepas toxigênicas de *B. bronchiseptica* são capazes de produzir hipoplasia dos cornetos nasais em leitões com até seis semanas de idade (DE JONG, 2007).

A rinite atrófica não-progressiva se caracteriza por espirros em leitões lactentes, a partir de uma semana de idade, podendo afetar leitões na fase de creche, devido a queda nos anticorpos maternos e ao reagrupamento de animais de diferentes idades. As alterações observadas na infecção por *B. bronchiseptica* sem complicações por outros agentes, são rinite catarral e alterações leves nas conchas nasais, podendo haver regeneração total das estruturas afetadas (BOROWSKI et al., 2007).

A bordetelose pulmonar se caracteriza por uma broncopneumonia em leitões lactentes, a partir dos 3 a 4 dias de idade, frequentemente associada a entrada da *B. bronchiseptica* em rebanhos livres, à adoção do sistema de desmame precoce segregado, bem como ao aumento na pressão de infecção e a uma diminuição na resistência do animal (BOROWSKI et al., 2007).

Brockmeier (2004) relata a importância da colonização precoce do trato respiratório superior dos suínos pela *B. bronchiseptica*, pois este agente favorece a colonização por outros agentes patogênicos, entre os quais, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, bem como o vírus da Síndrome

Reprodutiva e Respiratória dos Suínos.

A infecção pulmonar em animais mais velhos, fase de crescimento e terminação é menos freqüente, sendo a *B. bronchiseptica* considerada nestas fases um agente oportunista (DE JONG, 2007).

Vacinas contra infecção pela *B. bronchiseptica* têm sido desenvolvidas e utilizadas em muitos países, com uso limitado apenas para minimizar a influência da rinite atrófica não-progressiva e da bordetelose pulmonar em rebanhos infectados (DE JONG, 2007), porém dado o risco da ocorrência da rinite atrófica progressiva, vacinas conjugadas com bacterinas de *B. bronchiseptica* e *P. multocida*, ou mesmo o toxóide da *Pasteurella*, aplicadas somente nas matrizes, têm sido utilizado com maior freqüência, apresentando melhores resultados clínicos e zootécnicos (PEJSAK et al., 1994).

A melhora nas práticas de manejo e ambiente, como adoção do sistema “todos dentro – todos fora”, boa ventilação das instalações, compra de animais livres ao entrarem na granja são fundamentais para reduzir a ocorrência de casos clínicos (BOROWSKI et al., 2007).

Stark (2000) revisando controle de doenças multifatoriais, especificamente as doenças respiratórias em suínos, cita de maneira geral, as seguintes áreas de maior importância e seus pontos relevantes, os quais devem ser examinados:

- ambiente: envolvendo programa de limpeza e desinfecção, controle de vetores e roedores, tráfego de pessoas, animais e veículos na granja;
- manejo: densidade de alojamento, política de reposição, instalações, manejo alimentar e condições climáticas.

2.2.1 Características do agente

Bordetella bronchiseptica é um pequeno cocobacilo Gram negativo, móvel, aeróbio, não fermenta carboidratos e utiliza citrato. O agente tem sido isolado de leitões jovens com rinite, pneumonia e também de animais em rebanhos sem sinais clínicos de doenças respiratórias, bem como em outros mamíferos, incluindo cães, gatos, ratos e algumas vezes em humanos (DE JONG, 2007).

Em humanos, evidências sugerem a *B. bronchiseptica* ser encontrada como

comensal ou mesmo colonizando o trato respiratório, mas raramente como patógeno (GUEIRARD; GUIZO, 1993).

Brockmeier et al. (2002) relatam a necessidade do envolvimento de cepas toxigênicas de *B. bronchiseptica* para que se desenvolvam os quadros clínicos de rinite atrófica não progressiva e broncopneumonia em leitões, dependendo também da pressão de infecção e da idade de infecção.

Gueirard e Guiso (1993) afirmam existir variação na virulência das cepas de *B. bronchiseptica*, a qual está relacionada à expressão das adesinas protéicas: hemaglutinina filamentosa (150 kDa), fímbria (14 a 24 kDa) e pertactina (68 a 70 kDa); bem como à produção das toxinas: dermonecrótica (155 a 190 kDa), citotoxina traqueal (0,9 kDa) e adenilato ciclase hemolisina (216 kDa).

Todas adesinas estão relacionadas à colonização da cavidade nasal e aderência, principalmente das células epiteliais ciliadas da mucosa, já as toxinas, a dermonecrótica é a principal delas envolvida com a indução das lesões ósseas, principalmente nos osteoblastos, além de provocar alterações inflamatórias, proliferativas e degenerativas no epitélio nasal, com perda de cílios, no entanto a adenilato ciclase hemolisina é considerada o principal antígeno protetor contra infecção pela *B. bronchiseptica* (HORIGUCHI et al., 1991; GUEIRARD; GUIZO, 1993; BOROWSKI et al., 2007)

Kadlec et al. (2004) avaliando a sensibilidade de 349 cepas isoladas do trato respiratório de suínos infectados obteve a menor concentração inibitória mínima (CIM) em 90,0% dos isolados para tetraciclina e enrofloxacina (0,5 ug/ ml) e as mais altas CIM com tilmicosina e cefalotina (32 ug/ ml), bem como estreptomicina (256 ug/ ml).

A *B. bronchiseptica* é destruída em 30 minutos a 56°C, podendo sobreviver no solo por seis semanas e em meio líquido por mais de oito semanas a 21°C (BOROWSKI et al., 2007).

2.2.2 Diagnóstico da infecção por *B. bronchiseptica*

O diagnóstico definitivo da infecção por *B. bronchiseptica* é realizado através do isolamento e identificação do agente pelo exame bacteriológico, a partir de

secreções nasais, lavados pulmonares e pulmão de animais mortos (DE JONG, 2007).

O agente cresce bem em ágar MacConkey ou ágar sangue, mas o isolamento é frequentemente complicado pelo crescimento de outros organismos, Lariviere et al. (1993) comparando diferentes meios de cultivo para *B. bronchiseptica*, sendo as amostras coletadas a partir de suabes nasais, obteve os melhores resultados com ágar sangue suplementado com cefalexina.

Há possibilidade de realização do diagnóstico sorológico da infecção por *B. bronchiseptica* através da detecção de anticorpos aglutinantes no soro, visto que estes anticorpos estão bastante difundidos na população de suínos, no entanto, não é comumente empregado na rotina, sendo mais empregado o exame bacteriológico de suabes nasais (DE JONG, 2007).

Técnicas moleculares têm sido descritas para identificar amostras de *B. bronchiseptica*, como a reação em cadeia pela polimerase (HOZBOR et al., 1999; REGISTER; DE JONG, 2006) possibilitando a identificação de amostras toxigênicas, bem como a eletroforese em gel em campo pulsátil e amplificação randômica de DNA polimorfo, demonstrando a diversidade genômica do agente, informação importante na condução de estudos epidemiológicos, avaliação da eficácia de vacinas, resistência a antimicrobianos, entre outros (KADLEC et al., 2005; SHIN et al., 2007; SHIN; JUNG; HAHN, 2007).

2.3 CYTOMEGALOVIRUS

A primeira descrição de uma grande inclusão basofílica intracelular em células citomegálicas de glândulas mucosas de suínos foi feita por Done em 1955. Esta ocorrência de rinite em suínos designou o nome de "rinite por corpúsculo de inclusão". Infecções experimentais associadas com testes ultra-estruturais nos cornetos indicaram a presença um virion semelhante ao herpesvírus. Este agente também foi observado em glândulas salivares e lacrimais assim como em epitélio tubular renal. As lesões histológicas características foram descritas em conchas nasais de suínos em vários países (DUNCAN et al. 1965; VALACEK et al., 1970).

A forma e distribuição das lesões sugeriu que o agente pertencia ao grupo de

herpesvírus que afeta humanos e animais descrito como "vírus de glândulas salivares" (SMITH, 1959) depois como Cytomegalovírus (WELLER et al., 1960; PLUMMER, 1973) e finalmente o agente foi classificado na família *Betahespesvirinae* (MATTHEWS, 1982).

Este subgrupo de herpesvírus tem como característica um crescimento lento produzindo citomegalia com distintas inclusões intranucleares, tendem ser espécie específicos, normalmente induzem a uma infecção silenciosa em adultos além de infecção generalizada em animais jovens. O cytomegalovírus tem a habilidade de ultrapassar a barreira transplacentária e infectar o feto (EDINGTON, 2007).

Esta característica de formação de inclusões intranucleares em macrófagos localizados nos pulmões e em células de glândulas túbulo alveolares da mucosa nasal é que levou o vírus causador da "rinite de corpúsculo de inclusão" a ser denominado Cytomegalovírus suíno - PCMV (EDINGTON, 2007).

Plantéis suscetíveis ao vírus podem apresentar morte de leitões e fetos, rinite, pneumonia, assim como perda de peso. As conchas nasais em suínos são os locais mais susceptíveis à infecção, além do trato respiratório (HAMEL et al., 1999). Porém, em plantéis com um bom manejo, o vírus pode ser endêmico sem causar nenhuma perda econômica aparente (EDINGTON, 2007).

O vírus pode ser coletado de secreções oculares e nasais, urina e fluidos cervicais de fêmeas gestantes expostas à PCMV pela primeira vez. Em machos o vírus pode ser isolado dos testículos e epidídimo (BOOTH et al., 1967; SHIRAI et al., 1985) indicando a necessidade de acompanhamento também dos machos utilizados na reprodução. A disseminação mais comum do vírus é pela via nasal, porém o ambiente é também contaminado através da via urinária. Os aspectos epidemiológicos dos vírus incluem latência e infecção transplacentária, além de serem excretados em presença de anticorpos circulantes (EDINGTON, 2007).

2.3.1 Características do agente

A morfologia do PCMV é típica de um herpesvírus, com núcleo de 45 - 70 nm de diâmetro, uma cápsula icosaédrica de 80-100 nm, genoma constituído de uma fita

dupla de DNA de 125 a 230 Kb, sendo o segundo maior genoma viral (DUNCAN et al., 1965; VALACEK et al., 1970). O núcleo é usualmente alongado, variando para oval ou retangular. O Nucleocapsídeo tem uma capa eletrodensa separada do envelope por um halo translúcido. O envelope extracelular e citoplasmático do vírus tem projeções externas e uma estrutura de unidade de membrana clara (VALACEK et al., 1973). Como outros herpesvírus, partículas sem núcleo ou com núcleo translúcido, assim como citoplasma ou nucleocapsídeo extracelular sem envelope são freqüentemente observados “in vivo” e “in vitro” (EDINGTON, 2007).

O PCMV é sensível à cloroformio e éter (BOOTH et al., 1967), porém outras propriedades físico-químicas ainda não foram investigadas (EDINGTON, 2007).

Referente ao cultivo, a replicação do PCMV “in vitro” não foi muito fácil, L'ecuyer e Córner (1966) descrevem a passagem de um isolado por cinco vezes em células primárias de pulmão de suínos, enquanto, Watt et al. (1973), pesquisando a suscetibilidade de uma grande gama de tecidos, relatam que somente macrófagos pulmonares de suínos de 3 a 5 semanas de idade foram altamente sensíveis tanto para o primeiro isolamento como para repiques seriados. Citomegalia, formação de inclusões intranucleares e ocasionalmente pequenas inclusões intracitoplasmáticas foram observadas em 3 a 14 dias após inoculação, sendo que o tempo de aparecimento das inclusões variou de acordo com a titulação utilizada em cada inoculo (EDINGTON, 2007).

Estudos sistemáticos de replicação “in vitro” não foram reportados, porém células infectadas apresentam cerca de seis vezes o tamanho de uma célula normal, com aumento da mitocôndria, retículo endoplasmático e sistema de Golgi (DUNCAN et al., 1965). Inclusões pequenas e acidofílicas são vistas às vezes no núcleo e mais freqüentemente no citoplasma. As inclusões intranucleares grandes estão relacionadas com a formação de nucleocapsídeos freqüentemente na matriz cristalóide. O cápside ganha uma capa elétron densa no núcleo, enquanto o envelope é formado a partir da membrana nuclear, também encontra-se virions livres no citoplasma. Em estágio avançado da replicação conforme a célula é desintegrada, a matriz cristalóide do vírus pode ser observada no citoplasma (VALACEK et al., 1973).

2.3.2 Diagnóstico da infecção por PCMV

A presença de PCMV em plantéis de suínos é facilmente confirmada através da detecção de anticorpos por ELISA ou Imunofluorescência Indireta. Em porcas que apresentam desordem reprodutiva devem ser feito diagnóstico diferencial para Parvovirose e Doença de Aujeszky. O vírus pode ser isolado de neonatos ou fetos através de amostras de mucosas nasais, pulmões e rins, utilizados para culturas em células de macrófagos pulmonares. A observação das inclusões e citomegalias patognomônicas também podem ser detectadas através de histopatológico (EDINGTON, 2007).

Para determinação da presença do PCMV como componente dos quadros de rinite em plantéis suínos, o isolamento viral deve ser feito a partir de suabe nasal ou através de técnicas imunológicas (imunofluorescência/ imunohistoquímica) em fragmentos de cornetos nasais (EDINGTON, 2007).

Hamel et al. (1999) tendo em vista a alta porcentagem de suínos soropositivos para PCMV em diferentes regiões do mundo, desenvolveram oligonucleotídeos específicos para detecção do DNA viral através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Foram testados pulmões e fragmentos nasais de suínos com e sem sintomas da doença ou suspeita de rinite por corpúsculo de inclusão. Neste estudo, realizado no Canadá, foram utilizadas amostras de 126 suínos provenientes de 58 granjas, sendo 59% dos animais e 67% das granjas positivas para PCMV através da PCR (HAMEL et al., 1999). Estes dados indicam que o vírus realmente é endêmico no país e que em plantéis com alta biossegurança e boa qualidade de manejo os animais apesar de positivos para o vírus, não apresentam doença clínica.

A primeira PCR quantitativa para detecção de PCMV foi desenvolvida por Fryer et al. (2001) para auxiliar na avaliação de tecidos suínos com vista em futuros xenotransplantes (TAJIMA et al. 1993; HAMEL et al., 1999; WIDEN et al. 1999). A PCR quantitativa tem como objetivo mensurar a quantidade de vírus presente na amostra além de simplesmente classificá-la como positiva ou negativa para o agente.

3 OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de eliminação de *P. multocida* tipo A e D e de amostras carreadoras do gene codificador de toxina dermonecrótica através da PCR, em rebanhos suínos com diferentes protocolos de vacinação e sem vacinação contra o agente.
- Avaliar o perfil de eliminação de *Bordetella bronchiseptica*, em rebanhos suínos com diferentes protocolos de vacinação e sem vacinação contra o agente.
- Avaliar o perfil de eliminação de Cytomegalovirus suíno através da PCR.
- Confrontar os dados obtidos com as características dos rebanhos estudados.

4 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos utilizados na realização do trabalho encontram-se descritos a seguir.

4.1 Material

Foram selecionados nove sistemas de produção de suínos com presença de lesão em cornetos nasais em abatedouro e diagnóstico de pneumonia por *Pasteurella multocida* em fase de crescimento e terminação. Dentre os nove rebanhos, foram escolhidos três sem histórico de vacinação contra rinite atrófica progressiva. Foram selecionados ainda três rebanhos com vacinação de fêmea e leitão e três que vacinam apenas as matrizes (Quadro 1).

Em cada um dos rebanhos foram selecionadas aleatoriamente doze matrizes que foram submetidas à colheita de suabe de tonsila. No mesmo dia foram colhidos suabes de tonsila de 12 leitões com 20 dias e de suínos com 40, 60, 90, 110 e 140 dias de vida caracterizando um estudo transversal.

Após a colheita, as amostras dos suabes de tonsila foram congeladas em solução salina até o momento do processamento (-20°C).

Foram empregadas ainda cepas padrão de *Pasteurella multocida* tipo A, *P. multocida* tipo D, *P. multocida* tipo D toxigênica e *B. bronchiseptica* cedidas pelo Centro Nacional de Suínos e Aves (CNPSA) - Concórdia, SC. As amostras controle para amplificação do DNA de Cytomegalovirus suíno foram obtidas da mucosa nasal dois animais diagnosticados com rinite por corpúsculo de inclusão através de exame histopatológico no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia da FMVZ-USP em 2007.

Origem*	Número de matrizes	Vacinação	Rinite	Pasteurelose pulmonar
Granja A	1700	Sem vacinação	Sem sinais clínicos	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja B	200	Sem vacinação	Poucos sinais clínicos	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja C	600	Sem vacinação	Rinite acentuada (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja D	500	Matrizes Vacinadas	Rinite acentuada (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja E	4000	Matrizes Vacinadas	Rinite acentuada (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja F	9000	Matrizes Vacinadas	Rinite acentuada (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja G	500	Matrizes e leitões vacinados	Rinite mediana (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja H	500	Matrizes e leitões vacinados	Rinite mediana (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate
Granja I	1000	Matrizes e leitões vacinados	Rinite mediana (lesão ao abate)	Isolamento positivo, lesões em pulmão no abate

Quadro 1 - Propriedades selecionadas para realização do estudo

* As granjas são localizadas nos municípios de Boituva (SP), Holambra (SP), Cristais Paulista (SP), Jambéiro (SP), Cerqueira César (SP), São Sebastião da Gramma (SP), Capivari (SP) e Tapurah (MT).

4.2 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi a técnica utilizada para detectar o material genético dos agentes infecciosos nos suabes nasais, consistindo das seguintes etapas: extração do DNA bacteriano, amplificação do DNA e detecção especificamente do agente em questão, cujo detalhamento está discriminado a seguir.

4.2.1 Extração do DNA bacteriano

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

A um microtubo de 1,5 ml contendo a porção final do suabe de tonsila e 200 µl de solução salina, foi adicionado 1 ml do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100X 1ml, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 111,2 ml, EDTA 0,5M 8,8 ml). O microtubo foi agitado por 60 segundos e o suabe descartado. À suspensão restante foi adicionado 40 µl da suspensão carreadora (1gr Terra diatomácea, HCl 50 µl e 5 ml água ultrapura). O microtubo foi agitado por 1 minuto e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 90 segundos a 10.000 g. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1 ml do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 100ml). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona. Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37° C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foi adicionado 100µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo, este foi agitado por 1 minuto e mantido à 56 °C por 10 minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a

10.000g, o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização.

4.2.2 Amplificação do DNA

A PCR para detecção dos diferentes agentes em amostras de suabes de tonsila foi realizada em microplacas de 96 cavidades. Para tanto uma alíquota de 5 μl de DNA de cada suabe foi adicionada na cavidade correspondente, seguindo o desenho pré determinado para cada ensaio. Cada propriedade foi testada em uma microplaca de PCR contendo 84 amostras de DNA dos animais testados e 6 controles positivos (DNA bacteriano ou viral) e 6 controles negativos (água milliQ®). Para cada grupo de primers empregados foi montada uma microplaca.

4.2.3 Detecção de *P. multocida* e determinação do sorogrupo capsular

A detecção de *P. multocida* e determinação do sorotipo capsular foi realizada utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase sob a forma de Multiplex (M-PCR), descrita por Townsend et al. (2001), cujas seqüências encontram-se no quadro 2.

A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

Sorogrupo	Nome	Seqüência	Produto (pb)
Todos	KMT1T7	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	490
	KMT1SP6	GCTGTAAACGAACTCGCCAC	
A	CAPA-FWD	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1.044
	CAPA-REV	TTGCCATCATTGTCAGTG	
D	CAPD-FWD	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657
	CAPD-VER	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	

Quadro 2 - Seqüência de *primers* utilizados na M-PCR para detecção e tipagem de *P. multocida*.

Para amplificação do DNA utilizou-se o seguinte programa: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 60 segundos, 57°C por 60 segundos, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

4.2.4 Detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica

Para pesquisa do gene codificador da toxina dermonecrótica foram testados dois grupos de primers. Os primeiros descritos por Kamp et al. (1996) e o segundo Lichtensteiger et al. (1996), ambos apresentados no quadro 3.

Nome	Seqüência	Produto (pb)
Kamp et al. (1996)		
Pm 1 A	GGTCAGATGATGCTACATACTCC	338
Pm 1 B	CCAAACAGGGTTATATTCTGGAC	
Pm 3 A	CAAGTCTTAACTCCTCCACAAGG	217
Pm 3 B	GGGCTTACTGAATCACAAGAGCC	
Lichtensteiger et al, (1996)		
Ptox A	CTTAGATGAGCGACAAGG	846
Ptox B	GAATGCCACACCTCTATAG	

Quadro 3 - Seqüências de *primers* utilizados na PCR para detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica de *P. multocida*.

A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

Os programas utilizados variaram de acordo com os primers utilizados. Para os dois pares descritos por Kamp et al. (1996) utilizou-se 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 60 segundos, 63°C por 60 segundos, 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. A reação com os primers descritos por Lichtensteiger et al, 1996, foram submetidos a 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35

ciclos de 95^o C por 60 segundos, 55^oC por 60 segundos, 72^oC por 2 minutos e um ciclo final de 72^o por 5 minutos.

De acordo com os resultados obtidos uma das duas reações foi escolhida para avaliação de todos os isolados.

4.2.5 Detecção de *Bordetella bronchiseptica* e Cytomegalovirus suíno

A detecção de *Bordetella bronchiseptica* e Cytomegalovirus suíno foi realizada utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase sob a forma de Multiplex (M-PCR). Para detecção de *B. bronchiseptica* foram empregados os primers descritos por Hozbor et al. (1999), cujo produto de amplificação (tamanho 237pb) contém a região codificadora do gene estrutural da flagelina (gene *fla*). Os primers para detecção de Cytomegalovirus suíno foram descritos por Hamel et al. (1999), ambos descritos no quadro 4.

Agente	Primer	Seqüência	Produto (pb)
<i>B. bronchiseptica</i>	Fla 2	AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT	237
	Fla 4	TGGCGCCTGCCCTATC	
Cytomegalovirus suíno	PCMV1	CCCTGATCTTAAATGACGAGGACGTGAC	413
	PCMV2	ACCGTCTGAGAGACTGAACTTCTCTGACAC	

Quadro 4 - Seqüência de *primers* utilizados na M-PCR para detecção *Bordetella bronchiseptica* e Cytomegalovirus suíno.

Para amplificação do DNA utilizou-se o seguinte programa: 1 ciclo a 95^oC por 5 minutos, 35 ciclos de 95^o C por 60 segundos, 60^o C por 60 segundos, 72^oC por 90 segundos e um ciclo final de 72^o por 5 minutos.

4.2.6 Determinação do limiar de detecção

Para o estabelecimento do limiar de detecção dos *primers* selecionados foram utilizadas cepas padrão de *Pasteurella multocida* tipo A, *P. multocida* tipo D, *P. multocida* tipo D toxigênica e *B. bronchiseptica* cedidas pelo Centro Nacional de Suínos e Aves (CNPSA) - Concórdia, SC.

As cepas foram semeadas 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 feitas 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 agar sangue de carneiro, incubada a 37°C por 24 horas, para contagem de unidades formadoras de colônias.

4.2.7 Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação [10 µl produto e 0,7 µl de corante Blue Green (LGC biotecnologia)] foi realizada através da eletroforese em gel de Agarose 2,0 %, utilizando tampão TBE 0,5X. Após a corrida o gel foi fotografado através do Sistema “Image Master” (GE Healthcare). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de pares de base 100 bp DNA Ladder (LGC biotecnologia).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise estatística dos dados através do programa Minitab, empregando o teste Qui-quadrado, a fim de verificar a presença ou não de associação entre as variáveis, ao nível de significância de 1,0%.

5 RESULTADOS

Foi realizada a padronização da PCR para detecção de *Pasteurella multocida*, determinação do tipo capsular, e detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica, para tanto foi determinado o limiar de detecção dos pares de primers descritos por Townsend et al. (2001), indicados para determinação de gênero, espécie e tipo capsular (Figura 1) e dos primers descritos por Kamp et al. (1996) e Lichtensteiger et al, (1996) para detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica.

A PCR com os primers para gênero, espécie e tipo capsular apresentou um limiar de detecção de 10^3 UFC/ml, testando os pares de primers isoladamente e sob a forma de multiplex-PCR. Os dois grupos de primers testados para detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica apresentaram o mesmo resultado, ou seja, um limiar de detecção de 10^2 UFC/ ml de amostra (Figura 2).

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

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%. **Linha A** (primers descritos por Kamp et al, 1996) - Coluna 1 - Concentração inicial, Coluna 2-diluição 1×10^{-1} , Coluna 3 - 1×10^{-2} , Coluna 4- 1×10^{-3} , Coluna 5- 1×10^{-4} , Coluna 6- 1×10^{-5} , Coluna 7 a 11- 10^{-6} a 10^{-10} , coluna 12 amostra negativa; coluna 13 marcador de peso molecular 100 bp. **Linha B** - (primers descritos por Lichtensteiger et al 1996) - Coluna 1 - Concentração inicial, Coluna 2 - diluição 1×10^{-1} , Coluna 3 - 1×10^{-2} , Coluna 4- 1×10^{-3} , Coluna 5- 1×10^{-4} , Coluna 6- 1×10^{-5} , Coluna 7 a 11- 10^{-6} a 10^{-10} , coluna 12 amostra negativa; coluna 13 marcador de peso molecular 100 bp

A detecção de *P. multocida* tipo capsular A ou D através da PCR nos 756 suabes de tonsila, verificou apenas um animal de 20 dias positivo para a presença de *P. multocida* tipo A na Granja B. Todos os animais provenientes das nove propriedades avaliadas foram negativos para detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica de *Pasteurella multocida*.

O limiar de detecção observado para detecção de *B. bronchiseptica* através da reação empregada foi 10^2 UFC/ ml, não foi possível determinar o limiar de detecção do Cytomegalovirus suíno devido às dificuldades em realizar a quantificação deste agente viral. Um exemplo dos resultados obtidos através da reação multiplex empregada é apresentado na figura 3.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% - Coluna 1 - Amostra de *B. bronchiseptica*, Coluna 2 – Amostra de Cytomegalovirus suíno, Coluna 3 - Amostra de *B. bronchiseptica* e Cytomegalovirus suíno e Coluna 4- Controle negativo, Coluna 5 - marcador de pares de base 100 bp

Em resumo, dentre os 756 animais provenientes dos nove sistemas de produção de suínos, 22 (2,9%) foram positivos para presença de *B. bronchiseptica* e 198 (26,1%) para detecção Cytomegalovirus suíno, conforme demonstrado na tabela de frequência dos agentes pesquisados (Tabela 1).

	<i>Pasteurella</i>				
	<i>Bordetella</i>	<i>Cytomegalovírus</i>	<i>Pasteurella</i> tipo A e D	<i>Pasteurella</i> tipo D toxigênica	TOTAL
MATRIZES	3	0	0	0	3
20 DIAS	5	15	1	0	21
40 DIAS	0	73	0	0	73
60 DIAS	0	68	0	0	68
90 DIAS	3	19	0	0	22
110 DIAS	2	10	0	0	12
140 DIAS	9	13	0	0	22
TOTAL	22	198	1	0	221

Tabela 1 - Frequência dos agentes de rinite atrófica e pasteurelose pulmonar pesquisados, segundo a idade.

Os resultados observados de acordo com a granja e com a idade são apresentados nos gráficos 1 a 9.

Gráfico 1 - Distribuição dos agentes detectados na Granja A, nas respectivas idades

Gráfico 2 - Distribuição dos agentes detectados na Granja B, nas respectivas idades

Gráfico 3 - Distribuição dos agentes detectados na Granja C, nas respectivas idades

Gráfico 4 - Distribuição dos agentes detectados na Granja D, nas respectivas idades

Gráfico 5 - Distribuição dos agentes detectados na Granja E, nas respectivas idades

Gráfico 6 - Distribuição dos agentes detectados na Granja F, nas respectivas idades

Gráfico 7 - Distribuição dos agentes detectados na Granja G, nas respectivas idades

Gráfico 8 - Distribuição dos agentes detectados na Granja H, nas respectivas idades

Gráfico 9 - Distribuição dos agentes detectados na Granja I, nas respectivas idades

Dos nove rebanhos pesquisados, cinco foram positivos para detecção de *Bordetella bronchiseptica*. A compilação das amostras positivas segundo a idade, apresentou o perfil de eliminação representado no gráfico 10, ou seja, uma distribuição heterogênea, concentrando-se nas fases iniciais (matrizes e leitões de 20 dias) e terminais (amostras de 90 a 140 dias), sem a detecção de nenhuma amostra positiva nas idades intermediárias (40 e 60 dias de idade).

Há desta forma uma associação estatisticamente significativa, ao nível de significância de 1,0%, entre idade e eliminação do agente (teste qui-quadrado).

Gráfico 10 - Distribuição das amostras positivas para *Bordetella bronchiseptica*, nas respectivas idades

O perfil de eliminação do Cytomegalovírus nas diferentes granjas apresentou a distribuição inversa da *Bordetella*, com alta concentração de positivos nas fases de 40 a 60 dias de idade e nenhuma amostra positiva encontrada nos suabes das matrizes (Gráfico 11).

Da mesma forma que na *Bordetella*, há associação estatística ($p \geq 0,01$) entre idade e eliminação do agente, no mesmo nível de significância (teste qui-quadrado).

Gráfico 11 - Distribuição das amostras positivas para *Cytomegalovírus*, nas respectivas idades

Separando as amostras de acordo com as fases do sistema de produção de suínos nas quais foram coletados os suabes de tonsila, ou seja, maternidade (amostras das matrizes e leitões de 20 dias), creche (leitões de 40 e 60 dias de idade) e terminação (amostras de 90, 110 e 140 dias de idade) percebe-se uma maior ocorrência de determinados agentes em fases específicas (Tabela 2).

	<i>Bordetella</i>	<i>Cytomegalovírus</i>	<i>Pasteurella A</i>	TOTAL
MATERNIDADE	8	15	1	24
CRECHE	0	141	0	141
TERMINAÇÃO	14	42	0	56

Tabela 2 - Frequência dos agentes de rinite atrófica e pasteurelose pulmonar pesquisados, segundo a fase do sistema de produção

A *Bordetella* foi detectada somente nas fases de maternidade e terminação, sendo encontrados respectivamente, 36,3% e 63,7% das amostras positivas. Estatisticamente há associação entre a presença da *Bordetella* e estas duas fases, não sendo significativa, ao nível de significância de 1,0%, a diferença dos achados positivos em cada uma delas.

O *Cytomegalovírus* foi detectado em todas as fases da produção, porém com 71,2% de ocorrência na fase de creche, denotando também a associação

estatisticamente significativa ($p \geq 0,01$) da fase de creche e a eliminação deste agente pelos animais.

Com relação ao programa de vacinação contra rinite atrófica, as granjas A, B e C não vacinam os animais, as granjas D, E e F adotam vacinação apenas das matrizes contra esta enfermidade, enquanto as granjas G, H e I vacinam matrizes e leitões.

As granjas sem programa de vacinação contra rinite atrófica e pasteurelose concentraram 75,0% das amostras positivas para os diferentes agentes pesquisados na fase de maternidade (matrizes e leitões 20 dias de idade), além de apresentarem 42,4% das amostras positivas para *Cytomegalovirus* no início da creche, mais especificamente aos 40 dias de idade.

Independente do protocolo de vacinação adotado, não houve associação estatisticamente significativa ($p \geq 0,01$) entre a presença da *Bordetella* e o protocolo de vacinação em uso. A afirmativa também é verdadeira para o *Cytomegalovirus*, dadas as frequências encontradas nos diferentes protocolos de vacinação (Tabela 3).

	SEM VACINA	MATRIZES VACINADAS	TODOS VACINADOS	TOTAL
<i>B. bronchiseptica</i>	8	3	11	22
<i>Cytomegalovirus</i>	69	54	75	198
<i>P. multocida</i> tipo A	1	0	0	1
TOTAL	78	57	86	221

Tabela 3 - Frequência de amostras positivas para *Bordetella* e *Cytomegalovirus*, nos diferentes programas de vacinação contra rinite atrófica

6 DISCUSSÃO

As doenças multifatoriais, também chamadas de doenças de rebanho são amplamente distribuídas nas criações confinadas industriais, apresentando prevalências variáveis, mas com a tendência de permanecer nos rebanhos de forma enzoótica, afetando muitos animais, com baixa taxa de mortalidade e acentuado impacto econômico, devido aos seus efeitos negativos sobre os índices produtivos (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

Doenças respiratórias em suínos são multifatoriais e consideradas como sério problema sanitário na criação, dada a estrutura atual da produção com grandes grupos de animais alojados em condições intensivas, em ambientes fechados, frequentemente em regiões com alta densidade populacional de suínos, facilitando a transmissão de patógenos respiratórios dentro do próprio rebanho e entre rebanhos vizinhos (CHRISTENSEN et al., 1999).

O presente estudo propôs avaliar o perfil de eliminação dos patógenos respiratórios envolvidos com os quadros de rinite atrófica e pasteurelose pulmonar em suínos, cujos resultados serão discutidos a seguir.

6.1 PASTEURELLA MULTOCIDA

A baixa frequência de positivos encontrada para *Pasteurella multocida* (0,13%) difere de outros estudos. Stepan (1995) acompanhando o abate de 5987 suínos no ano de 1993 selecionou 3,8% pulmões com sinais clínicos de pneumonia e pleurite, isolando amostras de *P. multocida* em 1,6% do total, sendo a maioria das amostras caracterizada como *Pasteurella multocida* tipo capsular A (BOROWSKY, 2001).

Tratando-se da *Pasteurella multocida*, um habitante normal da cavidade nasal dos suínos (DE JONG, 2007), 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 *Mycoplasma hyopneumoniae* (PIJOAN, 1999; BOROWSKY, 2006; ROSS, 2006). Abilleira et al. (2007) avaliando 123 pulmões com pleurisia no frigorífico, isolou *P. multocida* em 47,9% das amostras, ocorrendo de forma isolada ou associada a outros agentes. Pijoan et al. (1984) examinando 113 pulmões de suínos com pneumonia isolou *P. multocida* em 70,8% das amostras, sendo 87,5% do tipo A e 12,5% do tipo D.

Towsend et al. (2000) pesquisando a presença de *P. multocida* através de suabes de tonsilas de animais abatidos, utilizando os mesmos primers na técnica de PCR, detectou 16 animais positivos em 36 amostras. Uma diferença entre o trabalho citado e o presente estudo consiste na manutenção por Townsend, dos suabes colhidos em meio de cultura específico (Amies Transport media) até o processamento das amostras, podendo explicar a reduzida quantidade de positivos encontrados ao não se utilizar tal meio.

A ampla utilização de antibióticos nos sistemas de produção de suínos (DAVIES, 2006), também auxilia na explicação da reduzida quantidade de positivos detectados, visto que das granjas pesquisadas, a única amostra positiva é oriunda da granja com menor utilização de antibióticos. Nesta propriedade, os animais não recebem medicação preventiva via ração ou água e o uso de antibióticos injetáveis é bastante limitado, diferentemente das outras granjas, nas quais há pelo menos um choque medicamentoso via ração.

Com relação à detecção das cepas de *P. multocida* tipo D, produtoras da toxina dermonecrótica, a ausência ou baixa quantidade de positivos ratifica os achados de MacInnes et al. (2008), onde pesquisando a prevalência de agentes respiratórios em leitões com seis semanas de idade oriundos de 50 rebanhos na região de Ontário, Canadá, detectaram em suabes nasais e tonsilares através de teste ELISA, a presença da toxina dermonecrótica em apenas um rebanho.

Lichtensteiger et al. (1996) demonstraram a completa concordância entre as técnicas de ELISA, PCR e letalidade em ratos na detecção da toxina dermonecrótica produzida pelas cepas de *Pasteurella multocida* tipo D.

Outros pesquisadores encontraram prevalências maiores. Iwamatsu e Sawada (1988) trabalhando com 336 pulmões de suínos com pneumonia e pleurisia, detectaram 116 amostras de *P. multocida*, sendo apenas 21 positivas para toxina

dermonecrótica, 18,1% dos isolados, caracterizadas através do teste de pele em porcos-da-índia.

Lariviere et al. (1993) não encontraram diferença na prevalência de *P. multocida* em rebanhos com ou sem sinais clínicos da rinite atrófica. Em 524 suabes nasais, 41,0% foram positivos para *P. multocida* quando cultivadas em ágar MacConkey e caracterizadas bioquimicamente. Deste percentual, 47,0% apresentaram cápsula tipo A e os 53,0% restantes, tipo D.

Moreno (2002) encontrou proporções diferentes, em 97 isolados de *Pasteurella multocida* caracterizou 74,2% como tipo capsular A e 22,7% como tipo D, sendo apenas metade delas produtora da toxina dermonecrótica.

O estudo longitudinal dos padrões sorológicos de diferentes infecções respiratórias em nove rebanhos suínos infectados na Dinamarca evidenciou uma soroconversão tardia à toxina dermonecrótica da *Pasteurella multocida* e em baixo nível, em todos os rebanhos pesquisados (ANDREASEN et al., 2000).

A explicação sugerida por MacInnes (2008) para a reduzida prevalência dos achados de *P. multocida* produtoras de toxina dermonecrótica consiste no aumento do uso de vacinas para controlar a rinite atrófica, fato este confirmado por De Jong (2007), o qual afirma que cepas toxigênicas de *P. multocida* podem ser eliminadas de rebanhos infectados após vacinação intensiva por um período mínimo de 5 anos, desde que sejam associadas outras medidas de manejo.

6.2 BORDETELLA BRONCHISEPTICA

Dos nove rebanhos examinados, cinco foram positivos para a eliminação de *Bordetella bronchiseptica*, no entanto, a prevalência de 2,9% de amostras positivas para este agente foi baixa, diferentemente de outros estudos. Lariviere et al. (1993) pesquisando o agente em 120 suabes nasais de rebanhos com ou sem sinais clínicos de rinite atrófica, encontrou uma prevalência de 38,3% de amostras positivas.

No mesmo estudo, o pesquisador comparou três meios de cultivo para a *B. bronchiseptica*, isolando-a em apenas dois suabes quando utilizou meio S-B. Removendo a anfotericina B deste meio, isolou em 40 amostras e no meio com

ágar-sangue suplementado com cefalexina obteve a maior quantidade de isolados, 46 dos 120 suabes avaliados (LARIVIERE et al., 1993).

Piffer et al. (1993) em infecção experimental cita o maior reisolamento nas tonsilas de *Pasteurella multocida*, 56,0% de positivos, quando comparado à *Bordetella bronchiseptica*, presente em apenas 16,0% dos animais, na ocorrência da infecção simultânea destes agentes nos suínos.

A situação inversa foi detectada nos suabes nasais, onde *B. bronchiseptica* foi detectada em 77,5% das amostras, e em apenas 17,8% conseguiu-se isolar *P. multocida* (PIFFER et al., 1993).

No presente estudo, devido a grande quantidade de contaminantes presentes na cavidade nasal dos suínos, optou-se por realizar os suabes de tonsila.

Da mesma forma que na *P. multocida*, a baixa frequência de positivos encontrada pode estar relacionada à não utilização de meio de cultura após a coleta, para manutenção dos suabes até o processamento.

Das amostras positivas obtidas no trabalho, a eliminação do agente concentrou-se em duas fases dos sistemas de produção de suínos, quais sejam, a maternidade, sendo eliminado tanto pelas matrizes, quanto pelos leitões de 20 dias e a terminação, com eliminação dos 90 aos 140 dias de idade.

A eliminação pelas matrizes ratifica a participação destes animais como fonte de infecção para os leitões, tanto para os casos de rinite atrófica, quanto nos casos de bordetelose pulmonar (BOROWSKY et al., 2007), seja pelo contato focinho-focinho, seja pela eliminação aérea, conforme demonstrado por diferentes estudos (BROCKMEIER; LAGER, 2002; HERMANN et al., 2008).

Especificamente para os casos de bordetelose pulmonar e rinite atrófica oriunda da infecção por *B. bronchiseptica*, gerando redução dos índices produtivos e conseqüente prejuízo econômico, Brockmeier et al. (2002) sugerem a necessidade do envolvimento de cepas toxigênicas.

Os leitões lactentes também eliminaram o agente, demonstrando a colonização precoce do trato respiratório superior, entre duas e três semanas de idade (DE JONG, 2007).

A maior eliminação de *B. bronchiseptica* na fase de maternidade foi detectada nas granjas sem programa de vacinação, o que apesar de não haver associação estatisticamente significativa, corrobora os achados de Éliás et al. (1993).

Comparando a imunidade e infecção por *B. bronchiseptica* em rebanhos na Hungria e Holanda, a colonização do trato respiratório dos leitões se deu entre a primeira e terceira semana de vida dos leitões nos rebanhos da Hungria e, na Holanda mais tardiamente, entre a terceira e quarta semana, sendo a diferença justificada pelo alto nível de IgA colostrar das matrizes holandesas, induzida pela vacinação, quando comparadas às húngaras, com proteção imunológica inferior (ÉLIÁS et al., 1993).

Nas granjas vacinadas, independente do programa de vacinação adotado, apenas duas matrizes foram positivas para *B. bronchiseptica*, confirmando a redução na eliminação do agente em rebanhos onde estes animais são vacinados durante anos (DE JONG, 2007).

A vacinação das matrizes contra *B. bronchiseptica* associada a ampla utilização de antibióticos na fase de creche (DAVIES, 2006) auxilia na explicação da ausência de positivos nas amostras de creche, ou seja, entre 40 e 60 dias de idade, apesar desta fase ser crítica na ocorrência da rinite atrófica, dado o estresse sofrido pelos animais no reagrupamento pós-desmame (BOROWSKY et al., 2007).

Das amostras positivas para *B. bronchiseptica* na fase de terminação, ou seja, entre 90 e 140 dias de idade, 71,4% foram obtidas em granjas que adotaram algum protocolo de vacinação contra este agente.

Apesar de não haver associação estatisticamente significativa entre programa de vacinação e a eliminação do agente, a adoção de vacina contra *B. bronchiseptica* sugere um maior desafio presente nestes sistemas de produção, justificando a adoção de medida específica para seu controle, o que é observado principalmente nas granjas que adotaram protocolo de vacinação em matrizes e leitões, nas quais estão 10 das 14 amostras positivas encontradas na fase de terminação.

Avaliando especificamente o envolvimento da *B. bronchiseptica* nos casos de broncopneumonia em suínos na fase de terminação, De Jong (2007) relata a baixa frequência de achados, mas salienta a importância deste agente como patógeno oportunista secundário.

Brockmeier (2004) trabalhando com a coinfeção experimental de suínos por *B. bronchiseptica* e *Hemophilus parasuis*, agente responsável pela Doença de Glässer, verificou que a infecção prévia dos animais pela *B. bronchiseptica* favorece a colonização do trato respiratório superior por outras bactérias patogênicas,

desempenhando papel importante no desencadeamento das doenças respiratórias suínas, de modo geral.

A ausência de imunidade passiva para *B. bronchiseptica* na fase de terminação e a queda na imunidade ativa presente nas granjas que vacinam leitões, associadas a agentes imunossupressores como o circovírus suíno tipo 2, amplamente difundidos nos rebanhos estudados, bem como a presença de fatores de risco para as doenças respiratórias descritos por Borowsky et al. (2007) e De Jong (2007) são as justificativas para eliminação da *B. bronchiseptica* na fase final de engorda dos suínos.

6.3 CYTOMEGALOVIRUS

Das agentes etiológicos pesquisados, o *Cytomegalovírus* apresentou maior prevalência, 26,1% de todas as amostras avaliadas, distribuídos nos nove rebanhos pesquisados.

Fryer et al. (2001) citam uma distribuição mundial deste agente, estando presente em 90,0% dos rebanhos no Reino Unido, muitos deles sendo bem manejados e com alto status sanitário.

A detecção através da PCR no Canadá, em 126 suínos com sinais clínicos da infecção por *Cytomegalovírus*, oriundos de 58 rebanhos, revelou uma prevalência do agente em 59,0% dos animais e 79,3% dos rebanhos, apesar do exame pós-morte detectar lesões histológicas da rinite viral em 59,0% dos animais positivos na PCR, ou seja, 35,0% de todas as amostras avaliadas (HAMEL et al., 1999).

Estes achados são esperados, visto que o agente pode ser endêmico em rebanhos bem manejados sem ocasionar qualquer perda econômica aparente, no entanto, em rebanhos susceptíveis pode causar infecção fetal transplacentária resultando em mumificação, natimortos, mortalidade neonatal e leitões refugos que apresentam rinite e pneumonia (EDINGTON, 2007).

Nenhuma amostra positiva foi detectada nas matrizes, o que pode ser explicado pela latência do *Cytomegalovírus* nos macrófagos pulmonares, sem necessariamente estar eliminando o agente (BRITO et al., 2007).

A eliminação precoce do agente pelos leitões de 20 dias, ainda na fase de maternidade, sugere a ocorrência da transmissão transplacentária, porém em rebanhos endêmicos, dada a ausência de sinais clínicos da infecção pelo *Cytomegalovírus* (EDINGTON, 2007).

Dos leitões lactentes que eliminaram o agente, 73,3% são oriundos de granjas sem vacinação contra rinite atrófica, o que apesar de não haver associação estatística entre eliminação do agente e programa de vacinação, pode ser atribuído a dois fatores principais, quais sejam, despreocupação com a mamada do colostro pelos recém-nascidos, dando pouca importância à imunidade colostrar, bem como a colonização precoce do trato respiratório superior pela *B. bronchiseptica* predispondo-o à outros agentes patogênicos, conforme relatado por Brockmeier (2004).

Há associação estatisticamente significativa entre a eliminação do agente e a fase de creche, ou seja, eliminação entre 40 e 60 dias de idade, visto que 71,2% amostras positivas para *Cytomegalovírus* concentram-se nestas faixas etárias.

Estes achados são condizentes com os citados por Brito et al. (2007), onde a eliminação do agente se concentra entre três e oito semanas de idade, com pico de eliminação entre sétima e oitava semana de vida, mas podendo ocorrer em suínos com mais de dez semanas de vida, apresentando alta morbidade.

Edington (2007) cita ainda uma menor quantidade de animais com um pico de eliminação do agente às três semanas de idade, encerrando-se na quinta semana, ou seja, autolimitante, sugerindo novamente a ocorrência de infecção transplacentária, ou pós-natal precoce nestes casos.

A maior eliminação do agente na fase de creche está relacionada ao estresse sofrido pelos animais no período pós-desmame, com mistura de lotes, mudança de ambiente, diminuição da imunidade passiva (EDINGTON, 2007), o que reforça a importância das boas práticas de manejo nos sistemas de produção de suínos, principalmente nestas fases críticas da criação.

7 CONCLUSÃO

- A baixa frequência de animais positivos para *Pasteurella multocida* pode estar relacionada à não utilização de meio de cultura após coleta dos suabes tonsilares, mas também a ampla utilização de antibióticos nos sistemas de produção de suínos, bem como à utilização de vacinas para o controle da rinite atrófica, reduzindo a presença de cepas produtoras da toxina dermonecrótica no campo.
- Novas pesquisas buscando evidências sorológicas da *P. multocida* no sangue e colostro das matrizes, bem como no sangue dos leitões associada às informações obtidas trará subsídios para uma interpretação mais apurada dos dados.
- O perfil de eliminação para *Bordetella bronchiseptica* concentrou-se nas fases de maternidade e terminação, sem nenhuma evidência da presença deste agente na fase de creche.
- Não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre programa de vacinação contra rinite e a eliminação da *Bordetella bronchiseptica*.
- *Cytomegalovírus* foi detectado em todos rebanhos pesquisados e apresentou um perfil de eliminação inverso ao apresentado pela *B. bronchiseptica*, concentrando 71,2% das amostras positivas na fase de creche.

REFERÊNCIAS

- ABILLEIRA, F. S.; MUSSKOPF, G.; FAUTH, E. E.; SILVA JR., V. B.; SCARTEZZINI, M.; VOGT, F. I.; IKUTA, N.; FALLAVENA, L. C. B.; RODRIGUES, N. C.; OLIVEIRA, S. J. Análise bacteriológica de casos de aderência pulmonar em carcaças de suínos de vários lotes abatidos em um frigorífico no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13., 2007. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007.
- ANDREASEN, M.; NIELSEN, J. P.; BAEKBO, P.; WILLEBERG, P.; BOTNER, A. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 45, p. 221-235, 2000.
- 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.
- 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. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 459-453, 1990.
- BOOTH, J. C.; GOODWIN, R. F.; WHITTLESTONE, P. Inclusion-body rhinitis of pigs: attempts to grow the causal agent in tissue cultures. **Research in Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 338-345, 1967.
- BOROWSKY, S. M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2001. 190 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- 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.

BOROWSKY, S. M.; BARCELLOS, D.; MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J. *Rinite Atrófica*. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 187-196.

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

BRITO, W. D.; ROEHE, P.; SOBESTIANSKY, J. *Rinite por corpúsculos de inclusão*. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 317-319.

BROCKMEIER, S. L. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 75-78, 2004.

BROCKMEIER, S. L.; LAGER, K. M. Experimental airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Bordetella bronchiseptica*. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 267-275, 2002.

BROCKMEIER, S. L.; REGISTER, K. B.; MAGYAR, T.; LAX, A.J.; PULLINGER, G. D.; KUNKLE, R. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 481-490, 2002.

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

CHRISTENSEN, G.; SORESEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the Respiratory Sistem. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 913-940.

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

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

DAVIES, P. R. Ongoing lessons from Danish 'experiments' on *Salmonella* control and restrictions of antimicrobial use in pork production. 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 84-91.

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 nonprogressive atrophic rhinitis. In: TAYLOR, D. J.; STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L. **Diseases of swine**. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 2007. p. 355-384.

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.

DUNCAN, J. R.; RAMSEY, F. K.; SWITZER, W. P. Electron microscopy of cytomegalic inclusion disease of swine (inclusion body rhinitis). **American journal of veterinary research**, v. 26, n. 113, p. 939-47, 1965.

EDINGTON, N. Cytomegalovirus. In: TAYLOR, D. J.; STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L. **Diseases of swine**. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 2007. p. 125-131.

ÉLIÁS, B.; KRÜGER, M.; GERGELY, P.; VOETS, R.; RAFAI, P. Interaction between immunity to *Bordetella bronchiseptica* and infection of pigs herds by *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida*. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 55, n. 4, p. 617-622, 1993.

FRYER, J. L.; GRIFFITHS, P. D.; FISHMAN, J. A.; EMERY, V. C.; CLARK, D. A. Quantitation of porcine cytomegalovirus in pig tissues by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1155-1156, 2001.

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. **Sri 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

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

HAMEL, A. L.; LIN, L.; SACHVIE, C.; GRUDESKEI, E.; NAYAR, G. S. PCR Assay for Detecting Porcine Cytomegalovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3767–3768, 1999.

HAMILTON, T. D. C.; ROE, J. M.; WEBSTER, A. J. F. Sinergistic role of gaseous ammonia in etiology of *Pasteurella multocida*-induced atrophic rhinitis in swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2185-2190, 1996.

HERMANN, J. R.; BROCKMEIER, S. L.; KYOUNG-JIN YOON; ZIMMERMAN, J. J. Detection of respiratory pathogens in air samples from acutely infected pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 367-370, 2008.

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

HOZBOR, D.; FOUQUE, F.; GUIZO, N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. **Research Microbiology**, v. 150, p. 333-341, 1999.

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, n. 6, p. 1200-1206, 1988.

KADLEC, K.; KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. Molecular basis of resistance to trimethoprim, chloramphenicol and sulphonamides in *Bordetella bronchiseptica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 485-490, 2005.

KADLEC, K.; KEHRENBURG, C.; WALLMANN, J.; SCHWARZ, S. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4903-4906, 2004.

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.

KASTEN, R. W.; CARPENTER, T. E.; SNIPES, K. P.; HIRSH, D. C. Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 41, p. 676-682, 1997.

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.

KICH, J. D.; PONTES, A. Análise da situação atual das doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. v.1, p.58-67.

LARIVIERE, S.; LEBLANC, L.; MITTAL, K. R.; MARTINEAU, G. P. Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 363-367, 1993.

L'ECUYER, C.; CORNER, A. H. Propagation of porcine cytomegalic inclusion disease virus in cell cultures: Preliminary report. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 30, p. 321-326, 1966.

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.

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 fur Bakteriologie**, v. 281, p. 45-54, 1994.

MAC INNES, J. I.; GOTTSCHALK, M.; LONE, A. G.; METCALF, D. S.; OJHA, S.; ROSENDAL, T.; WATSIN, S.; FRIENDSHIP, R. M. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 242-248, 2008.

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

MATTHEWS, R. E. E. **Classification and nomenclature of viruses**. Basel, London, New York: Karger, 1982. p. 49 -50.

MORENO, A. M. **Caracterização fenotípica e genotípica e isolados de *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* de suínos provenientes de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 78 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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.; IHM, P.; POHL, S.; FREDERICKSEN, W.; MANNHEIM, W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. anatis*, and *P. langaa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 309-322, 1985.

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. Lausanne. **Proceeding...** Lausanne: Pig Veterinary Society, 1990, p. 75.

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.

PEJSAK, Z.; WASINSKA, B.; MARKOWSKA-DANIEL, I.; HOGG, A. Field evaluation of thirteen regimens for the control of progressive atrophic rhinitis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 125-132, 1994.

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.

PIFFER, I. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BRITO, J. R. F. Reprodução experimental da rinite atrófica com *Pasteurella multocida* em leitões tratados com ácido acético ou inoculados com *Bordetella bronchiseptica*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 3, p. 249-262, 1993.

PIJOAN, C. *Pneumonic Pasteurellosis*. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 511-520.

PIJOAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C.; LEMAN, A. D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal of American Veterinarian Medicine Association**, v. 185, n. 5, p. 522-523, 1984.

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.

PLUMMER, G. Cytomegaloviruses of man and animals. **Prog Med Virol**, v. 15, p. 92-125, 1973.

REGISTER, K. B.; DE JONG, K. D. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 201-210, 2006.

RIMLER, R. B.; RHOADES, K. R. *Pasteurella multocida*. In: ADLAM, C; RUTTER, J.M.(Ed.). **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, n. 1-2, p. 13-29, 2007.

SHIN, E.; JUNG, R.; HAHN, T. Polymorphism of pertactin gene repeat regions in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs. **Journal of Veterinary Science**, v. 69, n. 7, p. 771-774, 2007.

SHIN, E.; SEO, Y.; HAN, J. H.; HAHN, T. Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 65-73, 2007.

SHIRAI, J.; NARITA, M.; IIJIMA, Y.; KAWAMURA, H. A cytomegalovirus isolated from swine testicle cell culture. **Nippon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science**, v. 47, n. 5, p. 697-703, 1985.

SMITH, M. G. The salivary gland viruses of man and animals. **Prog Med Virol**, v. 2, p.171–202, 1959.

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. *Classificação das doenças*. In: _____. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 15-19.

STÄRK, K. Epidemiological investigation of the influence of enviromental risk factors on respiratory diseases in swine – a literature review. **The Veterinary Journal**, v. 159, p. 37-56, 2000.

STEPAN, A. L. **Tipificação e sensibilidade de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas a partir de lesões de pleurite em suínos terminados**. 1995. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

TAJIMA, T.; HIRONAO, T.; KAJIKAWA, T.; KAWAMURA, H. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the seroepizootiological survey of antibodies against porcine cytomegalovirus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, p. 421–424, 1993.

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.

TOWSEND, 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 pgs in Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 69-78, 2000.

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.

VALACEK, L.; SMAD, B.; PLEVA, V. An electron microscopic study of pigeon herpesvirus in chick embryos. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. **Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 20, n. 2, p. 94-101, 1973.

VALACEK, L.; SMAD, B.; PLEVA, V.; MENSACK, J. Porcine cytomegalic inclusion disease virus. Electron microscopic study of the nasal mucosa. **Archiv fur die gesamte Virusforschung**, v. 32, n. 1, p. 19-30, 1970.

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

WATT, R. G.; PLOWRIGHT, W.; SABO, A.; EDINGTON, N. A sensitive cell culture system for the virus of porcine inclusion body rhinitis (cytomegalic inclusion disease). **Research in veterinary science**, v. 14, n. 1, p. 119-121, 1973.

WELLER T. H.; HANSHAW J. B.; SCOTT, D. E. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. **Virology**, v. 12, p. 130-132, 1960.

WIDEN, B. F.; LOWINGS, J. P.; BELAK, S.; BANKS, M. Development of a PCR system for porcine cytomegalovirus detection and determination of the putative partial sequence of its DNA polymerase gene. **Epidemiology Infectious**, v.123, p.177-180, 1999.

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.