

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO DE *Bordetella bronchiseptica* A PARTIR DE SUABES NASAIS DE  
SUÍNOS PELA BACTERIOLOGIA CLÁSSICA E PELA REAÇÃO EM CADEIA  
PELA POLIMERASE

**Tania Alen Coutinho**

**Porto Alegre**  
**2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO DE *Bordetella bronchiseptica* A PARTIR DE SUABES NASAIS DE SUÍNOS PELA BACTERIOLOGIA CLÁSSICA E PELA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Tania Alen Coutinho

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Medicina Veterinária Preventiva – Medicina de Suínos

Orientador: Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

Co-orientadoras: Dra. Mari Lourdes Bernardi e Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

**Porto Alegre**

**2006**



À minha mãe, o melhor exemplo de ser humano.

Aos meus amados irmãos e pai.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos, pela oportunidade do ingresso no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRGS e do desenvolvimento de experimentos na área de microbiologia;

À Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, pela valiosa co-orientação e ensinamentos repassados;

À Dra. Mari Lourdes Bernardi, pelas sugestões desde o primeiro projeto até a conclusão da redação desta dissertação e pelas constantes disposição e paciência;

À Dra. Andrea Micke Moreno, pela execução dos processamentos moleculares desta dissertação e constante disposição em esclarecer dúvidas;

Ao Sr. Dercílio Leite Totta, por todos ensinamentos, auxílio na produção de meios e reagentes e amizade;

À querida amiga Cintia Westphal Pereira, pelo breve auxílio nos experimentos, constante incentivo e, principalmente, pela amizade;

Às companheiras de laboratório: Sra. Erenice Oliveira da Silva, Dra. Goreti Ranincheski dos Reis e Dra. Sandra Maria Borowski, pela amizade;

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”, na pessoa do diretor Augusto César Cunha, por disponibilizar a infra-estrutura para que este trabalho e outros experimentos fossem realizados;

Às agroindústrias por disponibilizarem as granjas cooperandas às colheitas dos suabes nasais;

Aos docentes e colegas dos programas de pós-graduação (PPGCV, PPGMAA e PPG-Agronegócios) da UFRGS;

À “minha família gaúcha”: Mário Franco (*in memorian*), Elita Maria Deboni Franco, Raquel Deboni Franco e Rafaela Franco Ferreira, pelo teto, amizade e constante apoio;

À minha família, pelo suporte financeiro no primeiro ano em Porto Alegre e apoio e incentivo incansáveis;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado;

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) por proporcionar os meios financeiros para que este trabalho fosse realizado.

## RESUMO

A *Bordetella bronchiseptica* é um dos agentes etiológicos da rinite atrófica e de pneumonia em suínos. Embora os prejuízos econômicos gerados por esses distúrbios respiratórios sejam amplamente reconhecidos, o impacto desse patógeno na sanidade dos rebanhos é freqüentemente subestimado. Isso se deve, em parte, à dificuldade de isolar a *Bordetella bronchiseptica* a partir dos espécimes clínicos que em muitos casos está presente em pequeno número na cavidade nasal. Este trabalho descreve a determinação do meio de transporte mais adequado, às nossas condições, que favoreçam sua detecção da *Bordetella bronchiseptica* e a comparação de três meios seletivos para o seu isolamento. Também foram comparadas as sensibilidades dos meios de isolamento e da técnica de reação em cadeia pela polimerase. O meio de transporte que apresentou melhor desempenho, avaliando as temperaturas testadas (10°C e 27°C) em conjunto, foi o meio Amies com carvão. De acordo com os resultados obtidos e a praticidade de seu uso na rotina clínica, a temperatura de 27°C foi a eleita para o transporte dos espécimes. Os três meios seletivos empregados para o isolamento primário de *Bordetella bronchiseptica* a partir de suabes nasais mostraram semelhantes capacidades de recuperação da bactéria, mas o ágar MacConkey selecionou melhor os espécimes colhidos, recuperando um número maior de colônias. Mesmo usando o meio e a temperatura de transporte mais favoráveis para o transporte de suabes nasais e o meio seletivo mais sensível determinado neste estudo, a reação em cadeia pela polimerase apresentou uma capacidade de detecção da *Bordetella bronchiseptica* superior a do cultivo.

## **ABSTRACT**

***Bordetella bronchiseptica** is one of the etiological agents of atrophic rhinitis and pneumonia in swine. Although the economic losses generated by these respiratory disorders are widely recognized, the impact of this pathogen on herd health is frequently underestimated. The cause of this, in part, is the difficulty to isolate **Bordetella bronchiseptica** from clinical specimens, which, in many cases, is present in small numbers on the nasal cavity. The purpose of the present study was to establish optimal conditions for the recovery of **Bordetella bronchiseptica** from swine nasal swabs using the most efficient transport and primary isolation media. We also compared the sensitivities of isolation media and polymerase chain reaction technique. The transport medium Amies with charcoal presented the best performance, evaluating both tested temperatures (10°C and 27°C). According to the results and to the ease of its use in clinical routine, the temperature of 27°C was chosen to transport specimens. The three selective media compared for **Bordetella bronchiseptica** primary isolation from nasal swabs showed similar capability of bacterial recovery. But MacConkey agar was considered the best alternative, because it recovered higher numbers of colonies. Even using the better temperature and medium for nasal swabs transportation and the most sensitive selective medium determined in this study, the polymerase chain reaction presented superior capability of **Bordetella bronchiseptica** detection to culture.*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<b>1.1</b>	<b>Importância Econômica da Suinocultura Brasileira</b> .....	8
<b>1.2</b>	<b>Influência dos Problemas Respiratórios na Produção de Suínos</b> .....	8
<b>1.3</b>	<b>Infecção de Suínos por <i>Bordetella bronchiseptica</i></b> .....	9
<b>1.4</b>	<b>Histórico da Nomenclatura de <i>B. bronchiseptica</i></b> .....	11
<b>1.5</b>	<b>Taxonomia e Características do Gênero</b> .....	12
<b>1.6</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	15
<b>1.6.1</b>	Colheita e Transporte de Amostras .....	15
<b>1.6.2</b>	Cultivo Bacteriológico .....	17
<b>1.6.3</b>	Detecção de ácidos nucleicos pela PCR .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	22
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41



## **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Importância econômica da suinocultura brasileira**

Nos últimos 20 anos, a suinocultura brasileira se transformou em uma atividade moderna, tecnificada e altamente produtiva, abastecendo o mercado nacional com produtos de ótima qualidade e conquistando porção considerável do mercado mundial de carnes (RIORDAN, 2005).

Na balança comercial do agronegócio, a carne (aviária, bovina e suína) é o segundo produto mais exportado pelo Brasil, superado apenas pelo complexo-soja (óleo, farelo e grão) (CONAB..., 2005). Este fato revela a importância da carne na economia nacional, uma vez que o agronegócio é o setor responsável pela maior porção do superávit da balança comercial do país. Entre janeiro e setembro de 2005, o Brasil exportou 3.880.042 toneladas, representando US\$ 6.033.223.00,00 da balança do agronegócio, das quais 462.980 toneladas (US\$ 877.959,00) corresponderam à carne suína (em conserva, fresca/congelada e salgada), o que confirma a boa aceitabilidade e a incontestável qualidade da carne suína brasileira, cujas conquistas de novos mercados se encontram com as negociações em ritmo acelerado (SANTIAGO, 2005).

O crescente desenvolvimento da suinocultura brasileira vem contemplando cenários otimistas que compreendem: a expansão de mercados (mercado interno pela maior aceitação da carne suína pelo consumidor e mercado externo pela abertura de novos mercados antes restritos por barreiras sanitárias), o aumento da produção agrícola nacional pela absorção expressiva de grãos e o estímulo à permanência do homem no campo. Para que a suinocultura brasileira amplie sua capacidade competitiva, é necessária uma perfeita interação entre genética, nutrição, instalações, manejo e recursos humanos, de maneira a controlar e minimizar os efeitos negativos à produção, representados por ambientes adversos e problemas sanitários (SESTI; SOBESTIANSKY, 1998).

### **1.2 Influência dos problemas respiratórios na produção de suínos**

O crescimento da atividade suinícola implicou na adoção de sistemas intensivos de criação, significando que grandes populações seriam confinadas em espaços reduzidos. Nestas condições, o denominador comum dos diferentes sistemas de produção e dos estilos de manejo tem sido o desafio sanitário, que tem grande parte de seu impacto estabelecido em função das condições de confinamento e ambiência (RISTOW, 2005).

Altas densidades de alojamento em ambientes pobremente ventilados facilitam a transmissão aerógena de patógenos dentro de um rebanho (DONHAM, 1991), assim como entre rebanhos (CHRISTENSEN; SORENSEN; MOUSING, 1999). Conseqüentemente, distúrbios respiratórios e doenças sistêmicas transmitidas pelo ar são considerados, atualmente, alguns dos principais problemas da suinocultura moderna.

Significativos são os prejuízos de ordem econômica gerados pelas enfermidades respiratórias, que abrangem desde piora da conversão alimentar, redução no ganho de peso diário, gastos com medidas profiláticas e terapêuticas, condenações ou aproveitamentos condicionais das carcaças afetadas até perdas de animais por mortalidade ao longo das etapas de produção. Além das perdas a que os produtores estão submetidos quando da existência de problemas respiratórios em granjas, há o prejuízo relacionado ao bem estar dos animais, uma vez que qualidade de vida é obtida fundamentalmente por meio da integridade orgânica do ser vivo, ou seja, de sua saúde.

### **1.3 Infecção de suínos por *Bordetella bronchiseptica***

Um patógeno comumente envolvido em afecções do trato respiratório suíno é a *Bordetella bronchiseptica*, agente etiológico primário de uma forma de infecção da cavidade nasal conhecida como rinite atrófica e de broncopneumonia em leitões lactentes (REGISTER; ACKERMANN; DYER, 1995). A *B. bronchiseptica* atua como agente predisponente à colonização da mucosa nasal de suínos por outros microorganismos patogênicos, ou ainda, como potencializadora de infecções pré-instaladas (CHRISTENSEN; SORENSEN; MOUSING, 1999; DE JONG, 1999).

A principal entre essas associações é com a *Pasteurella multocida* tipo D toxigênica, a qual resulta em um quadro severo de infecção nasal conhecido como rinite atrófica progressiva. A infecção por *B. bronchiseptica* fundamenta-se na capacidade deste patógeno em colonizar o epitélio ciliado do trato respiratório superior por meio de fatores de virulência (adesinas e toxinas). E esta bactéria, ao aderir-se ao epitélio, promove um déficit na eficiência do mecanismo muco-ciliar por meio da estase ciliar e o aumento de secreção de muco pelas células caliciformes e glândulas túbulo-alveolares, o que permite a colonização desse epitélio por patógenos como a *P. multocida* (HARRIS; SWITZER, 1968; PEDERSEN; BARFOD, 1981; DUGAL; BÉLANGER; JACQUES, 1992; BEMIS; BURNS Jr., 1993), que, isoladamente, apresentam capacidade deficiente de colonização do referido tecido (JACQUES; PARENT; FOIRY, 1988; NAKAI et al. 1988; CHUNG; COLLINS; BÄCKSTRÖM, 1990; AMASS et al., 1994; BROCKMEIER et al., 2001).

Após a invasão e colonização do epitélio ciliado respiratório pela *P. multocida*, esta inicia a síntese de toxina dermonecrótica, que resultará em alterações osteogênicas severas nos focinhos de suínos (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Segundo elaboração de nomenclatura proposta por Pedersen *et al.* (1988), além da rinite atrófica progressiva existe ainda outro complexo patológico que faz parte da rinite atrófica de suínos, que é denominado de rinite atrófica não progressiva. A rinite atrófica não progressiva é causada exclusivamente pela *B. bronchiseptica* toxigênica e está restrita a atrofia leve a moderada de turbinados nasais (DE JONG, 1999).

Pneumonias por *P. multocida* (BROCKMEIER et al., 2001), assim como infecções sistêmicas por *Streptococcus suis* também podem ter seu início predisposto por infecções por *B. bronchiseptica* (VECHT et al., 1989).

A *B. bronchiseptica* tem sido isolada, além de suínos (DE JONG, 1999), de uma série de mamíferos como cães (WRIGHT, 1973), roedores de laboratório (BAKER, 1998), ratos e camundongos selvagens (SWITZER; MARÉ; HUBBARD, 1966; LE MOINE; VANNIER; JESTIN, 1987), gatos (JACOBS et al., 1993; MOLYNEUX et al. 2000; PASMANS et al., 2004), macacos (GOOD; MAY, 1971), e eqüinos (GALLAGHER, 1965). Apesar da *B. bronchiseptica* não ser considerada patogênica aos seres humanos, há relatos de infecções no trato respiratório superior associados à mesma (GOODNOW, 1980), distúrbios semelhantes à coqueluche em crianças (STEFANELLI et al., 1997), infecções em pacientes imunocomprometidos (PAPASIAN et al., 1987; WOOLFREY; MOODY, 1991) e até infecções relacionadas ao contato com animais infectados (GUEIRARD et al., 1995). Apesar das descrições do isolamento de *B. bronchiseptica* de uma variedade de animais, a maioria dos isolados das outras espécies parece possuir baixa virulência para suínos (ROSS; SWITZER; DUNCAN, 1967), mas é possível que roedores selvagens infectem-se com patógenos de suínos e, posteriormente, os transmitam aos mesmos (LE MOINE; VANNIER; JESTIN, 1987).

A rinite atrófica progressiva é uma enfermidade altamente prevalente e contagiosa em suínos, de evolução progressiva e crônica (SOBESTIANSKY et al., 1999). A prevalência da infecção por *B. bronchiseptica* em rebanhos de suínos é superior à observação de rinite atrófica clínica ou de lesões nos cornetos ao abate (CAMERON; GILES; SMITH, 1980).

O monitoramento periódico de lesões ao abate em suínos tem constituído uma fonte de informações sobre o estado sanitário dos rebanhos, uma vez que a frequência de

lesões ao abate é influenciada pela incidência da doença, pela taxa de resolução das lesões e pelo tempo de surgimento da doença (ROSTAGNO et al., 1999). Controle de lesões ao abate evidenciaram uma prevalência de lesões em cornetos nasais de 47,4% no estado de Santa Catarina (SOBESTIANSKI; PIFFER; FREITAS, 1990). Já Silva *et al.* (2001) relataram um aumento da prevalência de RA no Brasil de 49,4% em 1999 para 78,14% em 2001, assim como a severidade das lesões, que evoluíram de um grau leve para moderado. Esses levantamentos de lesões ao abate demonstram que a rinite atrófica é de ocorrência endêmica nos rebanhos brasileiros e que, tanto a prevalência quanto a severidade das lesões de cornetos nasais estão aumentando consideravelmente (SILVA et al., 2001).

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

A atrofia dos ossos turbinados nasais induzida pela *B. bronchiseptica* é a lesão macroscópica mais frequentemente observada, sendo geralmente menos severa que a induzida pela *P. multocida* (DE JONG, 1999). Esta lesão é causada pela inibição da osteogênese, devido aos danos promovidos aos osteoblastos e às células osteoprogenitoras pela ação da toxina dermonecrótica eliminada pela *B. bronchiseptica* (HORIGUCHI; NAKAI; KUME, 1991). A regeneração óssea dos cornetos nasais ocorre no período em que os leitões atingem o peso de abate (BEMIS; BURNS Jr., 1993).

#### **1.4 Histórico da nomenclatura de *B. bronchiseptica***

A *B. bronchiseptica* foi isolada pela primeira vez em 1910 e recebeu o nome de *Bacillus bronchicanis*, devido ao isolamento ter partido do trato respiratório de cães acometidos por cinomose (PITTMAN, 1984). Entre 1912 e 1913 foram isolados microorganismos, a partir de cobaias, macacos e humanos, com características idênticas às descritas em 1910. Em virtude desses acontecimentos, a *B. bronchiseptica* recebeu um novo nome: *Bacterium bronchisepticus*. Com o passar dos anos a bactéria teve quatro alterações de nomenclatura: *Alcaligenes bronchisepticus* (1925), *Brucella*

*bronchiseptica* (1929), *Alcaligenes bronchicanis* (1935) e *Haemophilus bronchisepticus* (1946) (GOODNOW, 1980). A classificação da bactéria nesses gêneros ocorreu em função de características morfológicas, bioquímicas e de crescimento, que eram, até certo grau, similares às de seus membros representantes (PITTMAN, 1984). Finalmente em 1952 a bactéria recebeu o nome que vigora até os dias atuais (*Bordetella bronchiseptica*), quando Moreno-López descreveu o gênero *Bordetella* em homenagem a Jules Bordet, que isolou pela primeira vez o microorganismo causador da coqueluche, a *Bordetella pertussis*.

### 1.5 Taxonomia e características do gênero

O gênero *Bordetella*, classificado como membro da família Alcaligenaceae, é representado por sete espécies: *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii* e *B. trematum* (HOPPE, 1999; GERLACH, 2001). Os membros dessas espécies são pequenos cocobacilos Gram-negativos, aeróbios estritos e têm crescimento ótimo em temperatura de 35 a 37°C (WEISS, 1992; BEMIS; BURNS Jr., 1993; HOPPE, 1999; GERLACH, 2001). O gênero também é assacarolítico, ou seja, não usa açúcares como fonte de carbono, pois os três genes que codificam as funções glicolíticas estão ausentes nos genomas deste gênero (PARKHILL et al., 2003). Como fonte primária de carbono e de energia, ao invés de carboidratos, utiliza aminoácidos e outros ácidos orgânicos (BEMIS; BURNS Jr., 1993).

A *B. bronchiseptica*, a *B. parapertussis* e a *B. pertussis* são responsáveis por distúrbios no trato respiratório superior de mamíferos, que envolvem a interação da bactéria com as células ciliadas do epitélio traqueal, resultando em estase ciliar e sua morte (BEMIS; BURNS Jr., 1993; GERLACH et al., 2001). Estas três espécies são reconhecidas como as de principal interesse clínico-científico dentro do gênero *Bordetella* e podem ser distinguidas das demais bordetelas por uma série de diferenças fenotípicas como crescimento em ágar peptona livre de sangue, motilidade, produção de urease e redução de nitrato (Tabela 1.).

**Tabela 1.** Características das espécies de *Bordetella*

	Bp <sup>1</sup>	Bpp <sup>2</sup>	<i>B. bronchiseptica</i> <sup>3</sup>	Ba <sup>4</sup>	Bho <sup>5</sup>	Bhi <sup>6</sup>	Bt <sup>7</sup>
Hospedeiro	Humanos	Humanos e ovinos	Mamíferos	Aves e répteis	Humanos (?)	Aves e humanos	Humanos (?)
Doença	Coqueluche	Coqueluche branda	Rinite atrófica (suínos), tosse dos canis (cães) e outras	Coriza dos perus	Septicemia e distúrbio respiratório	Septicemia ou sem sintomas	?
Conteúdo G+C (mol%)	66 - 68	66 - 68	66 - 68	62	61,5 - 62,3	65 - 67	64 - 65
Genoma (kbp)	3880-4060	> 4400	> 4400	ND■	ND	ND	ND
MacConkey	-**	+*	+	+	-/+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	+	-	+	-
Urease	-	+(24h)	+(4h)	-	-	+/-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	+	-	-	-	+/-
Motilidade (37°C)	-	-	+	+	-	+	+

Fonte: Modificado de HOPPE (1999) e GERLACH et al. (2001).

<sup>1</sup> *Bordetella pertussis*, <sup>2</sup> *Bordetella parapertussis*, <sup>3</sup> *Bordetella bronchiseptica*, <sup>4</sup> *Bordetella avium*, <sup>5</sup> *Bordetella holmesii*, <sup>6</sup> *Bordetella hinzii* e <sup>7</sup> *Bordetella trematum*.

■ não determinado, (?) condição de hospedeiro duvidosa por outras espécies, ? dúvidas sobre a capacidade de promoção de enfermidades pela bactéria.

\* positivo para crescimento em meio e reativo à prova bioquímica, \*\* negativo para crescimento em meio e não reativo à prova bioquímica.

Em contraste com outras bactérias patogênicas, a diversidade genética entre essas três espécies de bordetela é bastante limitada e foi estabelecida por rígidos critérios que incluem propriedades morfológicas, fisiológicas e antigênicas, estudos de hibridização DNA-DNA, estudos de eletroforese enzimática multiloco (MLEE) (MUSSER et al., 1986; VAN der ZEE et al., 1997), análise comparativa das seqüências das frações ribossomais 16S e 23S (MÜLLER; HILDEBRANDT, 1993). E esta estreita relação genética entre *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* e *B. pertussis* permite considerá-las como subespécies ou cepas de uma única espécie com adaptação a diferentes hospedeiros, ao invés de apresentá-las como espécies distintas (GERLACH et al., 2001).

Apesar dessas três bordetelas serem descritas até pouco tempo atrás como patógenos obrigatórios, existem relatos da sobrevivência e do crescimento de *Bordetella bronchiseptica* em lagoas e em tampão de fosfatos segundo Soerensen (PBS) (PORTER; PARTON; WARDLAW, 1991). A habilidade das *Bordetella* spp. em regular a expressão dos fatores de virulência em resposta a sinais externos (BEMIS; BURNS Jr., 1993), sugere

fortemente que as mesmas possuem “habitats” alternativos, onde a regulação desses fatores seria uma vantagem.

A maioria dos membros do gênero *Bordetella* é capaz de produzir fatores de virulência, que os auxiliem na adesão à célula ciliada e na manutenção da infecção do hospedeiro (Tabela 2.).

**Tabela 2.** Presença de fatores de virulência nas *Bordetella* spp.

Fator de virulência	Bp <sup>1</sup>	Bpp <sup>2</sup>	<i>B.</i> <i>bronc</i> <i>hisept</i> <i>ica</i> <sup>3</sup>	Ba <sup>4</sup>	Provável função na patogenicidade
PTX					
expressão	+*	-**	-	-	Adesão, invasão, interferência nas células imunes efectoras
gene	+	+	+	-	
CYA					
expressão	+	+	+	-	Interferência nas células imunes efectoras
gene	+	+	+	-	
CT	+	+	+	+	Estase ciliar e citotoxicidade
DNT					
expressão	+	+	+	+	Inflamação local e citotoxicidade
gene	+	+	+	+	
FHA					
expressão	+	+	+	-	Adesão e invasão
gene	+	+	+	-	
PRN					
expressão	+	+	+	-	Adesão e invasão
gene	+	+	+	-	
FIM					
expressão	+	+	+	+	Adesão e invasão
gene	+	+	+	+	

Fonte: Modificado de HOPPE (1999) e GERLACH et al. (2001).

<sup>1</sup> *Bordetella pertussis*, <sup>2</sup> *Bordetella parapertussis*, <sup>3</sup> *Bordetella bronchiseptica* e <sup>4</sup> *Bordetella avium*.

PTX – toxina pertussis, CYA – toxina adenilato ciclase, CT – citotoxina traqueal, DNT – toxina dermonecrótica, FHA – hemaglutinina filamentosa, PRN – pertactina e FIM – fimbria.

\* expressão ou presença de gene positiva, \*\* expressão ou presença de gene negativa.

Entre eles podem ser destacados os fatores de adesão e colonização como a hemaglutinina filamentosa, fimbria, proteínas de autotransporte que incluem a pertactina e toxinas como adenilato ciclase, toxina dermonecrótica e a citotoxina traqueal. A maioria desses fatores tem sua expressão controlada por um sistema regulatório, geneticamente conservado, denominado Bvg (“*Bordetella* virulence genes”), que responde a estímulos ambientais (BEMIS & BURNS Jr., 1993; GERLACH et al., 2001).

## 1.6 Diagnóstico

No caso de infecções de suínos por *B. bronchiseptica*, apesar dos sinais clínicos de rinite serem sugestivos do envolvimento da bactéria no distúrbio respiratório, o diagnóstico definitivo só será possível pelo exame bacteriológico das secreções nasais (LARIVIERE et al., 1993). No entanto, a identificação da *B. bronchiseptica* a partir de amostras clínicas é problemática, visto que a mesma representa um pequeno número do total de organismos presentes no hospedeiro e a lenta taxa de crescimento da bactéria também aumenta a chance de falsos negativos (REGISTER, 2000). Fatores como procedimentos de colheita incorretos, transporte demorado, crescimento excessivo de microbiota contaminante, requerimento de meio especial para isolamento e falta de experiência dos técnicos em reconhecer o organismo contribuem para dificuldade em isolar-se bordetelas (REGAN; LOWE, 1977).

### 1.6.1 Colheita e transporte de amostras

Secreções respiratórias são as amostras usuais para o diagnóstico bacteriológico direto de rinites em suínos e a obtenção das mesmas é rotineiramente realizada por meio de suabes nasais. A técnica de obtenção de amostras a partir das narinas de suínos é simples: o animal é contido e as narinas externas são limpas com etanol 70%. Após a evaporação, um suabe estéril, de haste flexível, é introduzido gentilmente no meato ventral com movimentos rotatórios até, aproximadamente, metade do comprimento da cavidade nasal (TORNOE; NIELSEN; SVENDSEN, 1976). Segundo Hoppe (1999), a permanência do suabe na nasofaringe por um período maior de tempo não parece aumentar a chance de isolar *Bordetella*.

Os materiais a partir dos quais os suabes são confeccionados também influenciam no sucesso da detecção das bordetelas. Suabes com cabeça de algodão são os menos adequados na recuperação ou detecção da bactéria, uma vez que suas fibras contêm inibidores (CLOUD; HYMAS; CARROLL, 2002). Uma alternativa seria a fibra de alginato de cálcio, que permite um melhor isolamento de *Bordetella*, pela ausência de toxicidade e pela melhor liberação do microorganismo, pois suas fibras dissolvem-se parcialmente (HOPPE, 1999). Fibras sintéticas do tipo “dracon” são levemente inferiores às fibras de alginato de cálcio no cultivo, mas preferidas para detecção por PCR, já que as fibras de alginato de cálcio e os componentes das hastes de alumínio mostraram-se inibitórios em alguns ensaios de PCR (WADOWSKY et al., 1994). Em contraste com Wadowsky e colaboradores, alguns estudos tiveram sucesso no uso de



suabes com haste de alumínio (HE et al., 1993; CLOUD; HYMAS; CARROLL, 2002) e com cabeças de fibras de algodão ou de alginato de cálcio (HE et al., 1993) para identificação de *B. pertussis* por PCR. Cloud, Hymas e Carroll (2002) avaliaram e notaram a inibição da PCR pelas fibras de alginato de cálcio e o bom desempenho dos suabes com fibras sintéticas (“dracon” e “rayon”) tanto na recuperação em cultivo como na detecção pela PCR.

O plaqueamento imediato das amostras nasais em um ágar apropriado evita a perda das bordetelas por minimizar a exposição a temperaturas inadequadas, levando a um crescimento mais precoce, e, por esta razão, preferível ao transporte (KURZYNSKI et al., 1988; MÜLLER; HOPPE; WIRSING von KÖNIG, 1997). Como este procedimento é pouco prático em situações de campo, faz-se necessário o uso de meios de transporte para a manutenção da viabilidade da *B. pertussis* nos suabes nasais no traslado entre a colheita e o laboratório (MORRILL et al., 1988).

O desempenho de um meio de transporte em geral depende da demora entre a colheita e o plaqueamento (GILCHRIST, 1991). Strebel *et al.* (1993) avaliaram técnicas de diagnóstico da coqueluche e relataram que o tempo de transporte prolongado de amostras de nasofaringe diminui a chance de positividade do cultivo, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa. Isto deve à supressão do desenvolvimento dos agentes de interesse pela contaminação bacteriana e fúngica da amostra em longos períodos de transporte (PRESTON, 1970).

Segundo estudos realizados com *B. pertussis*, se o período de transporte requerido for inferior a duas horas, as amostras (suabes nasais) podem ser transportadas em caldo de casoaminoácidos sob temperatura ambiente (CASSIDAY et al., 1994). Quando o período de transporte necessário for maior, mas não superior a 24 horas, o meio Amies com carvão, em temperatura ambiente, tem desempenho satisfatório (WIRSING VON KÖNIG; TACKEN; FINGER, 1988). Segundo alguns autores, se as amostras contidas nos suabes forem processadas no laboratório no mesmo dia da colheita, o meio de transporte não seria necessário (PRESTON, 1970; HUNTER, 1986). No entanto, Hoppe (1999) sugere que se o período entre a colheita e o processamento laboratorial for maior que 24 horas, meios contendo nutrientes e agentes seletivos que inibam a microbiota comensal serão os preferidos. O meio de transporte semi-sólido Regan-Lowe poderia preencher esses requisitos, pois foi observada uma melhor performance usando esse meio no transporte de *B. pertussis*, por período de 48 horas,

em relação ao meio Amies com carvão (REGAN; LOWE, 1977; CLOUD; HYMAS; CARROLL, 2002).

Quando os suabes são enviados aos laboratórios, são expostos à temperatura ambiente. Sistemas de transporte (suabe + meio de transporte) incubados a 36°C por um a dois dias antes do traslado até o laboratório permite a sobrevivência significativa de *B. pertussis* (MORRILL et al. 1988; HOPPE, 1999). Essa pré-incubação dos suabes pode aumentar o número de microorganismos na amostra, mas esse procedimento é válido apenas se a microbiota comensal puder ser controlada com agentes antimicrobianos (MORRILL et al., 1988). Em transporte realizado sob temperatura refrigerada, a 4°C, não foi observado excesso de crescimento da microbiota contaminante, mas o número de colônias de *B. pertussis* diminuiu em 75% (MORRILL et al., 1988).

No caso do transporte de suabes nasais de suínos visando o diagnóstico de infecção por *B. bronchiseptica*, não foram encontradas recomendações específicas na literatura consultada. No entanto, existe a descrição superficial de alguns meios e formulações utilizadas como mantenedores da viabilidade das amostras nasais no traslado entre os locais de colheita e de processamento laboratorial: caldo fosfato triptose acrescido de 10% de soro bovino (TORNOE; NIELSEN; SVENDSEN, 1976), solução tampão de fosfatos segundo Soerensen (PBS) contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino (SMITH; BASKERVILLE, 1979; CAMERON; GILES; SMITH, 1980), meio de transporte Amies com carvão (MÜLLER et al., 1997), caldo de soja tripticaseína (JENKINS et al., 1977). Existe também um trabalho realizado no nosso país que descreveu resumidamente o comportamento de *B. bronchiseptica* em salina e em três meios de transporte não nutrientes (Stuart, Amies com carvão e Cary & Blair) em relação à viabilidade da *B. bronchiseptica*, sendo constatado que o meio de Stuart foi o que permitiu manter maior número de bactérias por maior tempo, embora não tenha diferido significativamente da salina e dos meios de Amies e de Cary & Blair (BRITO et al., 1979).

### 1.6.2 Cultivo bacteriológico

A *B. bronchiseptica*, assim como quase todas as bactérias do gênero *Bordetella* (com exceção da *B. pertussis*), possui exigências nutricionais relativamente simples, que incluem nicotinamida, aminoácidos (exceto a arginina, lisina e histidina) e uma fonte de enxofre orgânico (cisteína, cistina ou glutatona), o que permite o fácil cultivo *in vitro*

em vários meios, incluindo o ágar MacConkey (PITTMAN, 1984; WEISS, 1992). Mesmo sendo uma bactéria de reduzida exigência nutricional, o uso de meio não seletivo para o isolamento primário de *B. bronchiseptica* a partir de amostras nasais resulta num crescimento deficiente ou até o não isolamento. Isso ocorre devido ao fato da *B. bronchiseptica* crescer mais lentamente do que a maioria dos microorganismos presentes na cavidade nasal (REGISTER; ACKERMANN; DYER, 1995). Dessa maneira, é sugerido o uso de meios seletivos para o isolamento primário da *B. bronchiseptica* a partir das secreções nasais.

Visando ao isolamento de *B. bronchiseptica* a partir de amostras colhidas de suínos, em 1963, o ágar MacConkey sofreu uma leve modificação por meio da suplementação de 1% de glicose (ROSS; SWITZER; MARÉ, 1963). Farrington e Switzer (1977) desenvolveram um novo meio seletivo baseado no ágar MacConkey modificado por Ross, Switzer e Maré (1963), promovendo a inibição de alguns gêneros Gram-positivos e de enterobactérias pela adição de 20µg/mL de furaltadona. Para suprimir as falhas apresentadas pelos meios desenvolvidos por Ross, Switzer e Maré (1963) e por Farrington e Switzer (1977) em estudos de prevalência de *B. bronchiseptica* realizados em rebanhos britânicos com rinite atrofica, Smith e Baskerville (1979) desenvolveram o meio seletivo G20G. As falhas dos meios podem estar associadas às características da microbiota nasal dos suínos e da própria *B. bronchiseptica*, uma vez que a bactéria apresenta desenvolvimento lento em relação aos microorganismos fermentadores da microbiota nasal e somente cresce em condições ambientais alcalinas (TORNOE; NIELSEN; SVENDSEN, 1976; SMITH; BASKERVILLE, 1979).

O meio G20G seleciona a microbiota nasal pelos antimicrobianos incluídos em sua composição (furaltadona, penicilina e gentamicina), além de permitir um reconhecimento colorimétrico de colônias pela presença de um indicador de pH, o azul de bromotimol. A colônia de *B. bronchiseptica* no meio G20G aparece verde-azulada devido à alcalinização gerada pelo metabolismo oxidativo (contrariamente à reação amarela de bactérias fermentativas) (WEISS, 1992). Quando o meio G20G foi confrontado com os meios descritos por Ross, Switzer e Maré (1963) e por Farrington e Switzer (1977), foi revelada a seletividade superior do meio G20G em relação aos mesmos (SMITH; BASKERVILLE, 1979).

Um meio seletivo para o diagnóstico simultâneo de *B. bronchiseptica* e *P. multocida* consistindo de ágar soja-triptona, 5% de sangue ovino desfibrinado,

5,0µg/mL de clindamicina-HCl, 0,75µg/mL de sulfato de gentamicina, 2,5µg/mL de telurito de potássio, 5,0µg/mL de anfotericina B e 15µg/mL de bacitracina, mostrou-se superior ao ágar MacConkey modificado e à inoculação em camundongos para o isolamento, respectivamente, de *B. bronchiseptica* e *P. multocida* (DE JONG; BORST, 1985).

Em estudo comparativo de métodos de recuperação de *B. bronchiseptica* e *P. multocida* a partir da cavidade nasal de leitões, houve um maior número de isolamentos de *B. bronchiseptica* pelo uso de ágar sangue acrescido de cefalexina (40µg/mL) em detrimento do uso do ágar MacConkey modificado e do G20G (LARIVIERE et al., 1993).

### 1.6.3 Detecção de ácidos nucléicos pela PCR

A despeito de seu valor, o cultivo possui algumas limitações. O tempo requerido para o crescimento de *B. bronchiseptica* em cultura normalmente é de dois dias e testes definitivos podem ser realizados somente após sub-cultivos, demandando tempo adicional para obtenção do diagnóstico final (WEISS, 1992).

Mesmo que o desenvolvimento *in vitro* de *B. bronchiseptica* não seja fastidioso, nem sempre a recuperação em cultivo de amostras positivas é obtida em função da competição com a microbiota normal. Estudos recentes da composição microbiana de amostras do meio ambiente revelaram que somente uma fração do total de espécies de bactérias é capaz de crescer em meio artificial (AMANN et al., 1991; LIESACK; STACKEBRANDT, 1992). Também na flora poli-microbiana humana, os microrganismos de possível identificação em cultivo *in vitro* provavelmente representam somente uma fração dos que estão presentes (EISENSTEIN, 1990). Assim, apesar do cultivo bacteriológico ser altamente específico, a sensibilidade do isolamento é baixa. E esta técnica diagnóstica poderia estar subestimando a incidência de infecções por *B. bronchiseptica*, uma vez que é capaz de detectar basicamente casos clinicamente diagnosticados (HOZBOR; FOUQUE; GUIZO, 1999).

A PCR é uma técnica molecular de detecção de ácidos nucléicos suficientemente sensível e específica para permitir o diagnóstico acurado de inúmeros patógenos. Esta técnica possui uma significativa vantagem sobre o cultivo *in vitro*: as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos não são limitadas pela capacidade do organismo crescer em cultura e a caracterização do amplicon pode prover importantes informações epidemiológicas e filogenéticas.

Alguns métodos de diagnóstico para *B. bronchiseptica* baseados na PCR já foram desenvolvidos. Reizenstein *et al.* (1993) desenvolveram uma PCR para detecção simultânea de *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* e *B. pertussis* a partir da amplificação da região promotora da toxina pertussis. No entanto, para detectar especificamente a *B. bronchiseptica*, foi necessário um passo adicional de clivagem enzimática dos fragmentos, visando diferenciar a *B. bronchiseptica* da *B. parapertussis*, uma vez que existe uma mutação numa das seqüências amplificadas.

Na tentativa de estabelecer uma PCR específica para *B. parapertussis*, utilizando o elemento de inserção 1001 (*IS1001*) como seqüência alvo, foram produzidos oligonucleotídeos específicos de *B. bronchiseptica* e *B. parapertussis* (VAN der ZEE *et al.*, 1993).

Douglas *et al.* (1993) obtiveram sucesso na detecção de *Bordetella* spp., a partir de suabes de nasofaringe humana, por meio do desenvolvimento de uma PCR baseada na amplificação do gene codificador da adenilato ciclase.

Somente em 1999 foi descrita uma PCR para detecção específica de *B. bronchiseptica*, cujo alvo de amplificação foi a região codificadora do gene estrutural da flagelina (gene *fla*) (HOZBOR; FOUQUE; GUIISO, 1999). A escolha dessa seqüência se deve ao fato de a *B. bronchiseptica* ser a única, entre as três principais espécies de bordetela, apta a expressar o flagelo (WEISS, 1992; COTTER; MILLER, 1994).

## 2. OBJETIVOS

Comparar os procedimentos para o isolamento de *B. bronchiseptica* a partir de suabes nasais de leitões.

Comparar a sensibilidade de detecção da *B. bronchiseptica* pelos métodos de isolamento bacteriano e de PCR.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

**Detecção de *Bordetella bronchiseptica* a partir de suabes nasais de suínos pela bacteriologia clássica e pela reação em cadeia pela polimerase**

O trabalho será submetido à Revista Brasileira de Microbiologia (Brazilian Journal of Microbiology) da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Detection of *Bordetella bronchiseptica* from swine nasal swabs by classic bacteriology and by polymerase chain reaction

Coutinho, Tania Alen <sup>1</sup>; Pereira, Cintia Westphal <sup>3</sup>; Bernardi, Mari Lourdes <sup>2</sup>; Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema <sup>1</sup>; Borowski, Sandra Maria <sup>3</sup>; Moreno, Andrea Micke <sup>4</sup>; Barcellos, David Emilio Santos Neves de <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 7712, CEP 91 540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor” (IPVDF), Est. Municipal do Conde 6000, CEP 92 990-000, Eldorado do Sul, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Av. Professor Orlando Marques de Paiva 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

\* Corresponding author: Fone/Fax: (51) 3316-6132, e-mail: [davidbarcellos@terra.com.br](mailto:davidbarcellos@terra.com.br)



**ABSTRACT** Three comparative assays were performed seeking to improve the sensitivity of the diagnosis of *Bordetella bronchiseptica* infection analyzing swine nasal swabs. An initial assay compared the recovery of *B. bronchiseptica* from swabs simultaneously inoculated with *B. bronchiseptica* and some interfering bacteria, immersed into three transport formulations (Amies with charcoal, trypticase soy broth and phosphate buffer according to Soerensen supplemented with 5% of bovine fetal serum) and submitted to different temperatures (10°C and 27°C) and periods of incubation (24, 72 and 120 hours). A subsequent assay compared three selective media (MacConkey agar, modified selective medium G20G and a ceftiofur medium) for their recovery capabilities from clinical specimens. One last assay compared the polymerase chain reaction to the three selective media. In the first assay, the recovery of *B. bronchiseptica* from transport systems was better at 27°C and the three formulations had good performances at this temperature, but the collection of qualitative and quantitative analysis indicated the advantage of Amies medium for nasal swabs transportation. The second assay indicated that MacConkey agar and modified G20G had similar results and were superior to the ceftiofur medium. In the final assay, polymerase chain reaction presented superior capability of *B. bronchiseptica* detection to culture procedures.

**KEY WORDS** *Bordetella bronchiseptica*, swine, transport media, selective media, PCR

**TÍTULO** Detecção de *Bordetella bronchiseptica* a partir de suabes nasais de suínos pela bacteriologia clássica e pela reação em cadeia pela polimerase

**RESUMO** Três ensaios comparativos foram feitos com o objetivo de aperfeiçoar a sensibilidade do diagnóstico da infecção pela *Bordetella bronchiseptica* a partir de suabes nasais de leitões. O experimento inicial comparou a recuperação de *B. bronchiseptica* a partir de suabes, simultaneamente inoculados com *B. bronchiseptica* e algumas bactérias interferentes, imersos em três formulações para transporte (meio Amies com carvão, caldo tripticaseína de soja e tampão de fosfatos segundo Soerensen suplementado com 5% de soro fetal bovino) e submetidos a diferentes temperaturas (10°C e 27°C) e períodos de incubação (24, 72 e 120 horas). O experimento subsequente comparou três meios seletivos (ágar MacConkey, meio seletivo G20G modificado e o meio de ceftiofur) em relação às suas capacidades de recuperação a partir de amostras clínicas. O último experimento comparou a reação em cadeia pela polimerase aos três meios seletivos. No primeiro experimento, a recuperação de *B. bronchiseptica* nos sistemas de transporte foi melhor a 27°C e as três formulações tiveram boas performances nesta temperatura, mas o conjunto das análises qualitativa e quantitativa apontou para o uso preferencial do meio Amies para o transporte de suabes nasais. O segundo experimento indicou que o ágar MacConkey e o G20G modificado mostraram resultados similares e foram superiores ao meio de ceftiofur. No experimento final, a técnica de reação em cadeia pela polimerase apresentou uma capacidade de detecção da *B. bronchiseptica* superior a do cultivo.

**PALAVRAS-CHAVE** *Bordetella bronchiseptica*, suínos, meios de transporte, meios seletivos, PCR

## INTRODUCTION

*Bordetella bronchiseptica* is the primary etiologic agent of atrophic rhinitis in swine and bronchopneumonia in young piglets (21) and represents a major impact to swine health worldwide. Although clinical signs of atrophic rhinitis can be suggestive of *B. bronchiseptica* infection (4), a definitive diagnosis can only be achieved by bacteriologic examination of nasal secretions (12). Swine nasal specimens are routinely shipped to laboratories under a variety of conditions: room temperature or under refrigeration, swabs immersed or not in transport medium with a transport time ranging from one to three days. Many other variables could interfere with the correct diagnosis, such as the primary isolation media employed to isolate the pathogen (9), since *B. bronchiseptica* grows more slowly than other bacteria present in the nasal cavity and the overgrowth with commensal flora during isolation procedures often occur (20).

Currently, there are few data to support recommendations to increase the probability to detect *B. bronchiseptica* from swine nasal swabs. The purpose of this study was to establish the best conditions for the recovery of *B. bronchiseptica* from swine nasal swabs using the most efficient transport and primary isolation media. We also compared the isolation media and PCR technique for their abilities to detect *B. bronchiseptica*.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Determination of a transport medium

The evaluated formulations to maintain the viability of *B. bronchiseptica* for 120 hours were Amies transport medium with charcoal (DIFCO 0832-17) (18), trypticase soy broth (TSB) (BD & Co. – 211825) (11) and phosphate buffered according to Soerensen added 5% (v/v) of bovine fetal serum (PBS+S)(23). The effect of storage temperature on the viability of *B. bronchiseptica* was also investigated. An isolate of *B.*

*bronchiseptica*, obtained from Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK, was used in the experiments. Bacteria used for mixed cultures consisted of *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from the collection maintained at the “Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor”, Eldorado do Sul, Brazil. These bacteria were chosen because some of these genera represent the major microorganisms of the swine nasal flora (8) or because they are frequently isolated from swine nasal cavity as contaminants. Each swab was inoculated with 200 $\mu$ L of *B. bronchiseptica* ( $10^3$  CFU/mL) and 4 $\mu$ L of mixed culture ( $10^2$  CFU/mL), both diluted in PBS (pH 7.3). Following this, swabs were immersed in tubes containing 2mL of testing formulations and incubated at different temperatures (10°C or 27°C) and periods (24, 72 and 120 hours). A total of 180 swabs were used in the experiment, since ten repetitions of the assay were processed. Bacterial titer was determined by Miles & Misra method (16) by inoculating serial 10-fold dilutions of swab cultures in PBS (pH 7.3) onto MacConkey agar (Oxoid CM7), incubating at 37°C for 48 hours and results were expressed as colony forming units (CFU)/mL. Percentage of recovered *B. bronchiseptica* was compared by Fisher’s Test and the number of CFU/mL was analyzed by GLM procedure, following its logarithmic conversion. Mean values were compared by Tukey-Kraemer (temperature 27°C) or t-test (temperature 10°C).

## **2. Determination of a primary isolation medium**

A new selective medium for of *B. bronchiseptica* was developed to compare with two other specific isolation media. The selectivity in this medium was guaranteed by the use of the antibiotic ceftiofur, due to the specific resistance of *Bordetella* to this drug (12) and the sensitivity of most of the bacteria present in swine nasal cavity (19). The minimal inhibitory concentration against ceftiofur reported previously for several

swine bacteria (22) was the base to test five ceftiofur concentrations (0,03µg/mL, 0,25µg/mL, 0,5µg/mL, 1,0 µg/mL and 1,5 µg/mL) to apply in the new selective medium. This determination of ceftiofur concentration was assessed by a productivity and selectivity test previously described (13).

A total of 50 piglets with age between 50-60 days from four nurseries presenting sneezing were sampled. Swabs of cotton fibers and aluminum shaft were transferred to Amies medium and transported at room temperature (as determined in the transport media experiment of this study) to the laboratory.

All swabs were processed in laboratory before 24h. They were streaked on MacConkey agar surface, modified G20G and ceftiofur medium (developed in this study) and all three media were incubated at 37°C for 48 hours. The ceftiofur medium contained per mL the following components: TSB (BD & Co. – 211825) 30mg, glucose 7.5mg, agar 20mg, bromothymol blue 80µg and ceftiofur 1µg. And G20G was modified in relation to the original medium (23) in the following way: furazolidone was used instead of furaltadone and agar concentration was raised from 1.5% to 2.0%. And the identification of *B. bronchiseptica* was based on colony morphology and biochemical characteristics, as previously proposed (14).

### **3. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella bronchiseptica***

The same 50 nasal specimens used in the experiment of primary isolation media were submitted to PCR, after preservation into 1.5mL microtubes, containing near 1mL of own transport medium of swab tubes and stored at –20°C. The DNA extractions of nasal swabs were processed according to the method of Boom et al. (2) and PCR was based in the method proposed by Hozbor *et al.* (10).

## **RESULTS**

### **Transport medium**

The qualitative growth of *B. bronchiseptica* in the three transport formulations at 10°C and 27°C incubation is presented in Table 1. The recovery capability of Amies and PBS was higher than TSB during the first 72h when swabs were incubated at 10°C ( $P<0.05$ ). Due to low *B. bronchiseptica* recovery with TSB formulation at 10°C in the first 72 hours, the quantitative comparison of recovery capabilities of *B. bronchiseptica* was performed only between Amies and PBS+S formulation. The number of recovered *B. bronchiseptica* cells at 24 and 72 hours was similar between Amies and PBS+S. However, at 120 hours incubation, Amies medium obtained a significantly higher bacterial count as compared to PBS+S (Table 2). Up to 72 hours, PBS+S and TSB presented no significant differences, but were superior to Amies. And at 120 hours, all the formulations differed significantly, and the highest recovery rate was obtained with TSB, followed by PBS+S and Amies (Table 2).

### **Selective medium**

On ceftiofur medium *B. bronchiseptica* formed after 48h of incubation small (near 1.2mm diameter), convex, smooth, green to blue with darker centre, transparent colonies with a blue reaction in the medium around them. This colony morphology was quite similar to the morphology presented G20G medium, which presented superior diameter (1.5-2.0mm) and inferior transparency. And the colonies on MacConkey agar were small (inferior to 1.0mm), convex, smooth, with pink hue and amber discoloration of the underlying medium.

Nine (18%) swine were positive for *B. bronchiseptica* isolation. The recovery rate of *B. bronchiseptica* was similar on MacConkey agar and modified G20G agar (14%, 7/50 samples), however, on this last medium the contaminant flora was present in higher number than MacConkey agar. The ceftiofur medium showed the worst

performance, with 8% (4/50) recovery rate. And considering the three selective media together, it increased the isolation capability of each alone.

### **Comparison of culture and PCR results**

Among sampled piglets, 26% (13/50) were positive by PCR, 18% (9/50) by culture and the two techniques had 14% (7/50) of concordance in positive results. Analyzing each tested isolation medium alone, PCR agreed positively with isolation on MacConkey agar, modified G20G and ceftiofur medium, respectively, in 12%, 10% and 8% assays. PCR technique failed to detect *B. bronchiseptica* when compared to positive isolation in MacConkey, modified G20G and ceftiofur medium, respectively, in 2%, 4% and 0% assays. MacConkey agar, modified G20G and ceftiofur medium failed to isolate *B. bronchiseptica* when PCR was positive, respectively, in 14%, 16% and 18% assays.

### **DISCUSSION**

*B. bronchiseptica* survived best in a transport system at 27°C and this could be explained by the nearness of this temperature to the optimal thermal condition of *B. bronchiseptica* as compared to the temperature 10°C. At room temperature, the organism starts its multiplication and the medium then harbors greater numbers of bacteria, easing survival during transportation (9). However, some authors demonstrated that room temperature should not be recommended, since overgrowth occurs and *Bordetella* do not multiply significantly (7). This is what possibly has happened in this study, since TSB, that represents the most nutritional medium among the three tested formulations, recovered *B. bronchiseptica* in fewer opportunities than Amies and PBS+S, probably due to competition with the mixed bacteria.

At 27°C, Amies medium showed the worst quantitative performance after 72 hours and this was already expected, since TBS has a rich nutritional composition and PBS+S was supplemented with bovine fetal serum. The number of *B. bronchiseptica* cells on

Amies medium and in PBS+S formulation at 10°C remained almost stable, with a slight increase up to 120 hours. The low temperature of incubation could possibly delay microorganism growth by a decrease of enzymatic activity (1).

When *B. bronchiseptica* was recovered, independently of thermal condition, the number of bacteria was never inferior to initial inoculum, attesting the three tested formulations as good media to maintain the viability of this pathogen during its transport to laboratory. However, at 10°C incubation Amies medium or PBS+S formulation recovered in average 99% less *B. bronchiseptica* cells than at 27°C during the three recovery periods tested. Morrill *et al.* (17) also related that specimens transported at refrigerated temperature (4°C) showed suppressed overgrowth, in the case of their study the *B. pertussis* colony numbers decreased by 75%.

The ceftiofur medium showed the worst result when compared to MacConkey agar and modified G20G regarding capacity of bacterial isolation. In contrast to our results, Lariviere *et al.* (12) found better performance of a selective medium for *B. bronchiseptica* using another cephalosporin (cephalexin) as the selective agent, comparing with MacConkey agar and G20G.

PCR obtained superior capability of *B. bronchiseptica* detection to culture in all three selective media. This could be explained by the fact that PCR does not distinguish between dead and viable bacteria (9).

The disagreement between culture and positive PCR could be explained by the higher sensitivity of the molecular technique. The sensitivity of culture could be affected by factors such as low number of *B. bronchiseptica* cells in nasal cavity (asymptomatic piglets) (21), presence of damaged or dead *B. bronchiseptica* cells before or during processing and animals previously submitted to antimicrobial therapy.



The disagreement of PCR with positive culture can be traced to several variables. Too few bacteria in nasal swabs could affect PCR sensitivity, as found in the usual protocol, which needs at least 10 organisms of *B. bronchiseptica* for detection (10). Components of swab (shafts and head fibers) could also inhibit PCR (24). In our work we collected specimens using aluminum shaft and cotton fiber head swabs, but apparently the composition had no negative influence in *B. bronchiseptica* detection, since PCR was more sensitive than culture. This finding needs to be validated, as we used just one type of swab. Other authors also did not find any inhibitory effect with swabs containing aluminum shafts (3). Some components of the transport medium, such as agar, could still affect PCR sensitivity (6). We used Amies medium and it contains agar, however it seemed not to affect the PCR, since samples containing pure culture of *B. bronchiseptica* immersed in Amies medium were previously successfully detected by PCR. DNA damage during storage could also negatively affect PCR, since the period of time between specimen collection and processing in our experiment was almost two months. Other hypothesis to explain the failure of PCR to detect *B. bronchiseptica* could be related to the presence of infection with a strain with an altered or mutated sequence in the region defined by the primers (15). Dragsted *et al.* (5) stated that the main factor that determines the quality of a PCR method is the design of primers, which should target a highly specific and preserved sequence in bacterial genome. The PCR protocol used in our study is highly specific, since the target DNA region chosen for primers design is the upstream region of the *fla* gene, a highly specific and preserved sequence in the *B. bronchiseptica* genome (10). The authors confirmed the sensitivity and specificity of this PCR protocol testing 30 *B. bronchiseptica*, 30 *B. pertussis*, 30 *B. parapertussis* and different isolates of bacterial and fungal genera often detected in the human respiratory tract (*Aspergillus* sp., *Candida*

sp., *Chlamydia* sp., *Haemophilus* sp., *Legionella* sp., *Mycoplasma* sp., *Staphylococcus* sp. and *Streptococcus* sp.).

## CONCLUSIONS

Amies and PBS+S were considered the most efficient transport media at 27°C of incubation, however, Amies medium was pointed as the preferential transport medium due to the ease of preparation. MacConkey agar and modified G20G could be employed successfully for *B. bronchiseptica* primary isolation. However, considering the number of recovered colonies in each medium, the ease of production and cost, MacConkey was considered the choice medium. Even using the best transport temperature and medium and using the most sensitive selective medium as defined in our study, culture was less sensitive than PCR. And while the combined use of molecular and bacteriological detection has markedly increased the detection capability as compared to the use of a single method, it was shown that only part of clinically diagnosed cases could be confirmed, pointing for the possible underestimated impact of *B. bronchiseptica* infection in swine herds.

## REFERENCES

1. Black, J.G. *Microbiology: principles and explorations*. New York, John Wiley & Sons, 1999, p 912.
2. Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Werthein-VanDillen, P.M.E.; Van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28 (3), 495-503, 1990.
3. Cloud, J.L.; Hymas, W.; Carroll, K.C. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (10), 3838-3840, 2002.
4. De Jong, M.F. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In: Leman, A.D. et al. *Diseases of Swine*. 8<sup>th</sup>.ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999, p.355-385.



18. Müller, F.-M.C., Hoppe, J.E.; Wirsing von König, C.-H. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *J. Clin. Microbiol.*, 35 (10), 2435-2443, 1997.
19. Prescott, J.F. Beta-lactam antibiotics: cephalosporins and cephamycins. In: Prescott, J.F.; Baggot, J.D.; Walker, R.D. (Eds.). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ames: Iowa State University Press, 2000. p.134-159.
20. Register, K.B.; Ackermann, M.R.; Dyer, D.W. Nonradioactive colony lift-hybridization assay for detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (10), 2675-2678, 1995.
21. Register, K.B. *Bordetella bronchiseptica* – An underestimated threat? *Pig Progress.*, 16, 10-11, 2000.
22. Salmon, S.A.; Watts, J.L.; Case, C.A.; Hoffman, L.J.; Wegener, H.C.; Yancey Jr., R.J. Comparison of mic's of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (9), 2435-2444, 1995.
23. Smith, I.M.; Baskerville, A.J. A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. *Res. Vet. Sci.*, 27, 187-192, 1979.
24. Wadowsky, R.M.; Laus, S.; Libert, T.; States, S.J.; Ehrlich, G.D. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. *J. Clin. Microbiol.*, 32 (4), 1054-1057, 1994.

**Table 1.** Qualitative growth of *B. bronchiseptica* at 10 and 27°C

Formulation	10°C			27°C			
	Incubation time	24 h (%)	72 h (%)	120 h (%)	24 h (%)	72 h (%)	120 h (%)
Amies		8/10* (80) a	9/10 (90) a	7/10 (70)	9/10 (90)	10/10 (100)	10/10 (100)
PBS+S <sup>1</sup>		4/10 (40) ab	7/10 (70) a	4/10 (40)	7/10 (70)	10/10 (100)	10/10 (100)
TSB <sup>2</sup>		2/10 (20) b	1/10 (10) b	5/10 (50)	8/10 (80)	9/10 (90)	7/10 (70)
		P<0.05	P<0.05	P=0.392	P=0.846	P=1.00	P=0.089

<sup>1</sup> phosphate buffer according to Soerensen added 5% of bovine fetal serum;

<sup>2</sup> trypticase soy broth;

\* Number of positive results/ total number of essay repetitions;

a,b Numbers followed by different letters, in the same column, are different (P<0.05).

**Table 2.** Quantitative growth of *B. bronchiseptica* at 10 and 27°C

Incubation time / Formulation	10°C						27°C																							
	24h		72h		120h		24h		72h		120h																			
	10 <sup>3</sup> UFC/mL	Log	10 <sup>3</sup> UFC/mL	Log	10 <sup>3</sup> UFC/mL	Log	10 <sup>6</sup> UFC/mL	Log	10 <sup>6</sup> UFC/mL	Log	10 <sup>6</sup> UFC/mL	Log																		
Amies	0.37 ± 0.31	2.48 ± 0.28	1.43 ± 1.55	2.88 ± 0.56	6.24 ± 3.42	3.73 ± 0.26 a	0.56 ± 0.43	4.78 ± 1.40	1.75 ± 0.44	6.23 ± 0.11a	2.51 ± 1.3	6.33 ± 0.27a																		
PBS + S <sup>1</sup>	0.52 ± 0.36	2.64 ± 0.31	5.80 ± 7.24	3.46 ± 0.60	2.30 ± 3.24	2.95 ± 0.76 b	0.83 ± 1.80	5.50 ± 0.66	23.85 ± 20.47	7.25 ± 0.33b	89.90 ± 75.81	7.75 ± 0.50b																		
TSB <sup>2</sup>							3.47 ± 3.74	5.80 ± 1.18	49.57 ± 38.53	7.48 ± 0.59b	584.71 ± 525.15	8.54 ± 0.53c																		
	P=0.390						P=0.031						P>0.05						P<0.0001						P<0.0035					

<sup>1</sup> phosphate buffer according to Soerensen added 5% of bovine fetal serum;

<sup>2</sup> trypticase soy broth;

a,b Values followed by different letters, in the same column, are different (P<0.05).

**ACKNOWLEDGEMENTS**

T.A.C. is a grantee from CAPES, at the Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

This work was supported by FAPERGS.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rinite atrófica é uma enfermidade respiratória que pode determinar consideráveis prejuízos econômicos à produção suinícola. Apesar do conhecimento amplo da associação da *Bordetella bronchiseptica* e da *Pasteurella multocida* na determinação da rinite atrófica, pequena importância é atribuída à *B. bronchiseptica*, uma vez que é a *P. multocida* a responsável pelos quadros mais severos e pelo conseqüente baixo ganho de peso.

Diversos fatores contribuem para a incerteza a respeito do impacto real da *B. bronchiseptica* nos suínos e é na dificuldade em detectar bordetelas a partir de amostras clínicas que pode estar existindo o mascaramento maior do papel da bactéria na produção de suínos.

A prática de limpeza dos focinhos dos leitões previamente às colheitas de amostras nasais deve ser ressaltada como um dos pontos críticos para o aumento da chance de isolamento de *B. bronchiseptica*, uma vez que a redução da microbiota contaminante foi observada em relação às colheitas realizadas sem limpeza prévia.

O uso de meio de transporte é essencial para a manutenção das bordetelas, considerando que as recuperações de *B. bronchiseptica* a partir de suabes secos (ausência de meio de transporte) foram nulas em diversas situações, de acordo com os experimentos pilotos realizados previamente. Segundo nossos resultados, os meios que garantem a viabilidade de *B. bronchiseptica* no traslado das amostras nasais são o Amies com carvão e o PBS+S. Em função do custo e da facilidade de produção, foi sugerido o uso preferencial do meio Amies com carvão.

A escolha das condições térmicas de transporte testadas nesta dissertação procurou mimetizar os procedimentos rotineiramente empregados a campo, ou seja, transporte refrigerado e sob temperatura ambiente. Nossos resultados apontaram o uso de transporte não refrigerado como a condição que permite melhor viabilidade de *B. bronchiseptica*, o que tornaria mais prática a rotina de envio de amostras para os laboratórios. No entanto, o uso de transporte não refrigerado, mesmo em meio não nutritivo como o Amies, não deve ser empregado em transportes que exijam longo período de traslado, considerando que o crescimento dos contaminantes é mais rápido do que da *B. bronchiseptica* e que o meio não contém agentes selecionantes.

Por ser a cavidade nasal um ambiente extremamente contaminado torna-se imperativo o uso de meios contendo agentes seletivos para o isolamento primário de



microorganismos presentes na mesma. O ágar MacConkey e o G20G modificado foram os meios que apresentaram melhor desempenho em nossos experimentos e no de outros autores. No entanto, sugerimos o uso preferencial do ágar MacConkey para o isolamento de *B. bronchiseptica*, considerando que este é um meio rotineiramente utilizado na maioria dos laboratórios de microbiologia, de fácil preparo, custo inferior ao G20G e pela recuperação de maior número de colônias de *B. bronchiseptica*.

O cultivo de patógenos microbianos a partir de amostras clínicas permanece como a pedra fundamental do laboratório clínico até o momento. Apesar de seu valor, o cultivo possui algumas limitações, que podem ser superadas pela adoção de técnicas moleculares de diagnóstico, como a PCR. Como esperado, a PCR foi mais sensível que o cultivo de *B. bronchiseptica* nos três meios seletivos testados em nosso trabalho. No entanto, houve algumas amostras positivas para cultivo, mas negativas para PCR e vice versa. Essas “falhas”, de ambas as técnicas, podem ser justificadas por inúmeros fatores intrínsecos às técnicas, como também por fatores externos as mesmas. De acordo com nossos resultados, o uso associado das duas técnicas diagnósticas (cultivo e PCR) seria o procedimento mais acertado para garantir o diagnóstico mais próximo da situação real de um rebanho em relação às infecções por *B. bronchiseptica*.

Apesar das possibilidades abrirem-se para a adoção em conjunto desta técnica de amplificação de ácidos nucleicos e do cultivo, dificilmente esta prática se concretizará em futuro próximo. Uma vez que a PCR demanda, para sua inserção na rotina, altos investimentos em materiais (permanente e de consumo) e a maioria dos laboratórios não dispõe de recursos para esse fim.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. et al. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. **Nature**, v.351, p.161-166, 1991.

AMASS, S. F. et al. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.204, n.1, p.102-107, Jan. 1994.

BAKER, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and *B. bronchiseptica* and their effects on research. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p. 231-266, Apr. 1998.

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

BLACK, J.G. **Microbiology: principles and explorations**. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1999, p.912.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

BRITO, J.R.F. et al. Comportamento de *Bordetella bronchiseptica* em meios de transporte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 10., 1979, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1979. n.34, p.45.

BROCKMEIER, S.L et al. Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. **American Journal Veterinary Research**, v.62, p.521-525, 2001.

CAMERON, R.D.A.; GILES, C.J.; SMITH, I.M. The prevalence of *Bordetella bronchiseptica* and turbinate (conchal) atrophy in English pig herds in 1978-1979. **Veterinary Record**, v.107, p.146-149, 1980.

CASSIDAY, P.K. Viability of *Bordetella pertussis* in four suspending solutions at three temperatures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1550-1553, 1994.

CHRISTENSEN, G.; SORENSEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW et al. (Eds.). **Disease of Swine**. 8<sup>th</sup>.ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1999. p.913-940.

CHUNG, W-B.; COLLINS, M.T.; BÄCKSTRÖM, L.R. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to swine nasal ciliated epithelial cells *in vitro*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v.98, p.453-461, 1990.

CLOUD, J.L.; HYMAS, W.; CARROLL, K.C. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.10, p. 3838-3840, Oct. 2002.

CONAB divulga pesquisa sobre custo de produção de aves e suínos. Disponível em: <<http://www.diariodecuiaba.com.br>>. Acesso em: 28 nov. 2005.

COTTER, P.A.; MILLER, J.F. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in rabbit model. **Infection and Immunity**, v.62, n.8, p.3381-3390, Aug. 1994.

DE JONG, M.F.; BORST, G.H.A. Selective medium for the isolation of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. **Veterinary Record**, v.9, p.167, Feb. 1985.

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

DONHAM, K.J. Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p.1723-1730, 1991.

DOUGLAS, E. et al. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of adenylate ciclase gene. **Journal of Medical Microbiology**, v.38, p.140-144, 1993.

DRAGSTED, D.M. et al. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.749-754, 2004.

DUGAL, F.; BÉLANGER, M.; JACQUES, M. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.56, 260-264, 1992.

EISENSTEIN, B.I. New opportunistic infections - more opportunities. **New England Journal of Medicine**, v.323, p.1625-1632, 1990.

FARRINGTON, D.O.; SWITZER, W.P. Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.170, n.1, p.34-36, 1977.

GALLAGHER, G.L. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from horses. **Veterinary Record**, v.77, p.632-633, 1965.

GERLACH, G et al. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. **Microbes and Infection**, v. 3, p.61-72, 2001.

GIBB, A.P.; WONG, S. Inhibition of PCR by agar from bacteriological transport media. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.275-276, Jan. 1998.

GILCHRIST, M.J.R. *Bordetella*. In: BALOWS et al. (Eds.) **Manual of Clinical Microbiology**. 5<sup>th</sup>. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, Chap. 46, 1991, p.471-477.

GOOD, R.C.; MAY, B.D. Respiratory pathogens in monkeys. **Infection and Immunity**, vol.3, n.1, p.87-93, Jan.1971.

GOODNOW, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. **Microbiology Reviews**, v.44, n.4, p.722-738, Dec. 1980.

GUEIRARD, P. et al. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.8, p. 2002-2006, Aug. 1995.

HALPERIN, S.A.; BORTOLUSSI, R.; WORT, A.J. Evaluation of culture, immunofluorescence, and serology for the diagnosis of pertussis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.4, p.752-757, Apr. 1989.

HARRIS, D.L.; SWITZER, W.P. Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined inoculum. **American Journal Veterinary Research**, v.29, n.4, p.777-785, Apr. 1968.

HARRIS, D.L.; ROSS, R.F.; SWITZER, W.P. Incidence of certain microorganisms in nasal cavities of swine in Iowa. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, n.9, p. 1621-1624, Sep. 1969.

HE, Q. et al. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.642-645, 1993.

HOPPE, J.E. *Bordetella*. In: MURRAY, P.R. et al. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Washington, DC: ASM Press, 1999, p.116-37.

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

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

HUNTER, P.R. Survival of *Bordetella pertussis* in transport media. **Journal of Clinical Pathology**, p.119, 1986.

JACQUES, M.; PARENT, N.; FOIRY, B. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal and tracheal epithelial cells. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, p.283-285, 1988.

JACOBS, A.A.C. et al. Feline bordetellosis: challenge and vaccine studies. **Veterinary Record**, v.133, p.260-263, 1993.

JENKINS, E.M. et al. Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine of southeastern Alabama. **American Journal Veterinary Research**, v.38, n.12, p.2071-2074, Dec. 1977.

KURZYNSKI, T.A. et al. Comparison of modified Bordet-Gengou and modified Regan-Lowe media for the isolation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.12, p.2661-2663, Dec. 1988.

LARIVIERE, S. et al. 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.364-367, Feb. 1993.

LE MOINE, V.; VANNIER, P.; JESTIN, A. Microbiological study of wild rodents in farms as carriers of pig infectious agents. **Preventive Veterinary Medicine**, v.4, p. 399-408, 1987.

LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.5072, 1992.

LONGO, D.S. et al. Controle de Qualidade. In: \_\_\_\_\_. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos**. < S.L.: s.n > , 1991/1992. , Cap. II, p.6-19.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 912.

MAEDE, B.D.; BOLLEN, A. Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. **Journal of Medical Microbiology**, v.41, p.51-55, 1994.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. Estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732, 1938.

MOLYNEUX, J.M. et al. Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* in cats attended by veterinary practice in the Manawatu region. **New Zealand Veterinary Journal**, v.48, p.82-84, 2000.

MORRILL, W.E. et al. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. **Journal Clinical Microbiology**, v.26, n.9, p.1814-1817, Sep. 1988.

MÜLLER, M.; HILDEBRANDT, A. Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella avium*, and their implications for phylogenetic analysis. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.14, p.3320, 1993.

MÜLLER, F.-M.C.; HOPPE, J.E.; WIRSING von KÖNIG, C.-H. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.10, p.2435-2443, Oct. 1997.

MUSSER, J.M. et al. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. **Journal of Bacteriology**, v.166, n.1, p.230-237, Apr. 1986.

NAKAI, T. et al. Adherence of *Pasteurella multocida* or *Bordetella bronchiseptica* to the swine nasal epithelial cell in vitro. **Infection and Immunity**, v.56, p.234-240, 1988.

PAPASIAN, C.J. et al. *Bordetella bronchiseptica* bronchitis. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.25, n.3, p.575-577, Mar. 1987.

PARKHILL, J. et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. **Nature Genetics**, v.35, n.1, Sep. 2003, p.32-40. Disponível em: <<http://www.nature.com/naturegenetics>>. Acesso em: 13 fev. 2004.

PASMANS, F. et al. **Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* in cats from different environments**. Disponível em: <[http://www.felineB.bronchiseptica.info/disease/references/Abstracts/Full\\_article\\_Pasmans\\_et\\_al\\_2001.html](http://www.felineB.bronchiseptica.info/disease/references/Abstracts/Full_article_Pasmans_et_al_2001.html)>. Acesso em: 18 abr. 2004.

PEDERSEN, K.B.; BARFOD, K. The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. **Nordisk Veterinær Medisin**, v.33, p.513-522, 1981.

PEDERSEN, K.B. et al. Atrophic rhinitis in pigs: proposal for a revised definition. **Veterinary Record**, p.190-191, Feb. 1988.

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

PITTMAN, M. Genus *Bordetella* Moreno-López 1952. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.1, Baltimore, MD: Wiliam & Wilkins Co., 1984, p.388-393.

PORTER, J.F.; PARTON, R.; WARDLAW, A.C. Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1202-1206, Apr. 1991.

PRESCOTT, J.F. Beta-lactam antibiotics: cephalosporins and cephamycins. In: PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, Ames: Iowa State University Press, 2000, p.134-159.

PRESTON, N.W. Technical problems in the laboratory diagnosis and prevention of whooping-cough. **Laboratory Practices**, v.19, p.482-486, 1970.

REGAN, J.; LOWE, F. Enrichment medium for isolation of *Bordetella*. **Journal Clinical Microbiology** v.6, n.3, p. 303-309, Sep. 1977.

REGISTER, K.B.; ACKERMAN, M.R.; DYER, D.W. Nonradioactive colony lift-hybridization assay for detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.10, p.2675-2678, Oct. 1995.

REGISTER, K.B. *Bordetella bronchiseptica* – An underestimated threat? **Pig Progress**, v.16, n.1, p.10-11, 2000.

REIZENSTEIN, E. et al. Diagnostic evaluation of polymerase chain reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.17, p.185-191, 1993.

RIORDAN, M.A. **Mais uma vez... Até quando?** Disponível em: <<http://www.suinos.com.br/noticias>>. Acesso em: 28 nov. 2005.

RISTOW, L.E. **Doenças na fase de creche**, artigo 22. Disponível em: <<http://www.engormix.com>>. Acesso em: 28 nov. 2005.

ROSS, R.F.; SWITZER, W.P.; MARÉ, C.J. Incidence of certain microorganisms in Iowa swine. **Veterinary Medicine**, v.58, p.562-565, 1963.

ROSS, R.F.; SWITZER, W.P.; DUNCAN, J.R. Comparison of pathogenicity of various isolates of *Bordetella bronchiseptica* in young pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.31, p.53-57, Feb. 1967.



ROSTAGNO, M.H. et al. Estudo da associação entre doenças respiratórias em suínos, através do monitoramento de lesões ao abate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, IX., 1999, Belo Horizonte Alegre. **Anais.** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p.167-168.

SALMON, S.A. et al. Comparison of MIC's of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. **Journal Clinical Microbiology**, v.33, n.9, p.2435-2444, Sep.1995.

SANTIAGO, E.J. **Indicadores da Agropecuária**, ano XIV, nº10, out. 2005. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 28 nov. 2005.

SESTI, L.A.C.; SOBESTIANSKY, J. Aspectos da produtividade. In: SOBESTIANSKY *et al.* **Suínocultura Intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho.** 1ª.ed. Concórdia: Embrapa-CNPSo, 1998, cap. 2, p.27-43.

SILVA, A.F. et al. Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I - Estudo do perfil de doenças respiratórias nas regiões sul, sudeste e centro-oeste Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais.** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.31-32.

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

SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I.A.; FREITAS, A.R. Prevalência de rinite atrófica e de pneumonia em granjas associadas a sistemas de integração de suínos, no estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, n.1/2, p.23-26, Jan-Jul. 1990.

SOBESTIANSKY, J. et al. Rinite Atrófica. In: \_\_\_\_\_. **Clínica e Patologia Suína.** 2ª.ed. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1999. 464, p.374-378.

STEFANELLI, P. et al. Molecular characterization of two *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from children with cough. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.6, p.1550-1555, Jun. 1997.

STREBEL, P. et al. Pertussis in Missouri: evaluation of nasopharyngeal culture, direct fluorescent antibody testing, and clinical case definition in the diagnosis of pertussis. **Clinical Infectious Diseases**, v.16, p.276-285, Feb. 1993.

SWITZER, W.P.; MARÉ, C.J.; HUBBARD, E.D. Incidence of *Bordetella bronchiseptica* in wildlife and man in Iowa. **American Journal of Veterinary Research**, vol.27, n.119, p. 1134-1136, Jul. 1966.

TORNOE, N.; NIELSEN, N.C.; SVENDSEN, J. *Bordetella bronchiseptica* isolations from the nasal cavity of pigs in relation to atrophic rhinitis. **Nordisk Veterinaer Medizin**, v.28, p.1-18, 1976.

VAN der ZEE, A. et al. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2134-2140, 1993.

VAN der ZEE, A. et al. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three different insertion sequences. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.21, p.6609-6617, Nov. 1997.

VECHT, U. et al. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type II after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.1037-1043, 1989.

WADOWSKY, R.M. et al. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n. 4, p.1054-1057, Apr. 1994.

WEISS, A.A. The genus *Bordetella*. In: A. BALOWS, H.G. et al. **The prokariotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1992. v.3, p. 2530-2543.

WIRSING VON KÖNIG, C.H.; TACKEN, A.; FINGER, H. Use of supplemented Stainer-Scholte broth for the isolation of *Bordetella pertussis* from clinical material. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.12, p.2558-2560, Dec. 1988.

WOOLFREY, B.F.; MOODY, J.A. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.3, p.243-255, Jul. 1991.

WRIGHT, N.G. et al. *Bordetella bronchiseptica*: a re-assessment of its role in canine respiratory disease. **Veterinary Record**, v.93, p.486-487, 1973.