



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDO DA PATOGENIA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE  
DIAGNÓSTICO DA PASTEURELOSE PNEUMÔNICA EM SUÍNOS**

**JOÃO XAVIER DE OLIVEIRA FILHO**

**PORTO ALEGRE**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDO DA PATOGENIA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE  
DIAGNÓSTICO DA PASTEURELOSE PNEUMÔNICA EM SUÍNOS**

**Autor: João Xavier de Oliveira Filho**

Tese apresentada como requisito para obtenção de grau de  
Doutor em Ciências Veterinárias, especialidade na Área de  
Sanidade Suína.

**Orientador:** Dr. David Emílio Santos Neves de Barcellos

**PORTO ALEGRE**

**2014**

### CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira Filho, João Xavier de  
Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos  
de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos /  
João Xavier de Oliveira Filho. -- 2014.  
121 f.

Orientador: David Emílio Santos Neves de  
Barcellos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2014.

1. Pasteurella multocida. 2. Patogenicidade. 3.  
Modelo de infecção. 4. Suínos. I. Barcellos, David  
Emílio Santos Neves de, orient. II. Título.

**João Xavier de Oliveira Filho**

**Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos**

Aprovado em 13 de Março de 2014.

APROVADO POR

---

Dr. David Emílio Santos Neves de Barcellos

Orientador e Presidente da Comissão

APROVADO POR

---

Dr. Roberto Mauricio Carvalho Guedes

Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Dr. Daniel Linhares

Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Dr. Sérgio José de Oliveira

Membro da Comissão

Aos meus professores, em especial minha mãe Elizabeth e ao meu pai João Xavier (*in memoriam*), exemplos de bondade, amor, respeito e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me abençoar e guiar minha vida.

A minha mãe Elizabeth (betinha), meu pai João Xavier (*in memoriam*), minhas irmãs Joelg e Joanne e aos meus dois sobrinhos Marquinho e Gabriel por sempre estar ao meu lado, me apoiando, dando força e me proporcionando momentos únicos de alegria em cada encontro.

Ao meu professor e orientador David Barcellos que, além dos ensinamentos técnicos sobre suinocultura, sempre me mostrou como ser um bom profissional, com ética, humildade e conhecimento.

Aos professores Fernando Bortolozo e Ivo Wents pelos ensinamentos, compartilhando seus conhecimentos e pelos conselhos pessoais e profissionais. Agradeço também a todos os alunos de pós-graduação e estagiários do Setor de Suínos da UFRGS em especial aos meus colegas e amigos da turma de pós-graduação de 2010 (Paulo, Aline, Natalha e Djane) e ao Diogo Magnabosco, Thomas, Carine, Lídia, Júlia, Karine, Sato e Thais. Agradeço-os por todos os momentos de alegria, companheirismo e aprendizagem. Ainda, agradeço a Carol Pissetti pela amizade, conselhos, apoio e ajuda.

Agradeço a Nádia e Fabiana pela amizade, companheirismo, confiança, ensinamentos e por me acolher em Porto Alegre.

Aos meus professores Valéria Dutra e Luciano Nakazato (UFMT) pela amizade, ensinamentos e incentivo na carreira profissional.

Aos meus amigos e família Ricardo, Jerry, Alessandro, Raquel Menacho, Paula, Gis, Luana, Carol, Daphine, Rodrigo, Fernanda, Marcelo Augusto, Gabriela e Raquel Sales que mesmo distantes, sempre estiveram presentes na minha vida.

A toda equipe da Embrapa Suínos e Aves, em especial ao meu orientador Nelson Morés que, do meu estágio de graduação ao curso de mestrado e doutorado, acreditou em mim, me ensinando e oferecendo a oportunidade de participar de sua equipe. Agradeço ainda ao Marcos Morés, Raquel Rebelatto, Armando, Daiana, Jalusa, Raquel Rech, Maurício Cantão, Franciana, Francielli, Kelen, Arlei, Luizinho, Valter Piazzon, Cátia Klein, Djalmo, Altair, Herno, Gerson, Dhamer, Edeilena, Tatiane, Suzana Satomi, Márcia C. da Silva, Emanuéli,

Caio Zaccaro, Juliana Bassani e Juliana Lazaroto. Muitos se tornaram amigos e todos tiveram uma importante participação nesse trabalho.

A minha família de Concórdia, Dona Izabelita, Sr. Cirilo Bonissoni e a todos seus familiares que me acolheram como um filho e irmão, me ensinando o valor da vida a cada dia de convivência. Agradeço ainda aos meus amigos Dona Laura, Sr. Tôni, Washington Trigueiro, Fernando Tavernari, Marcelo, Nelise, Priscila, Adriane, Cintia, Jane, Ana, Vivian, Giseli, Camila Sá Rocha, Tânia, Chanaisa e Tainá pela amizade, companheirismo e momentos de alegria.

A toda equipe do Cedisa pela oportunidade, acolhimento e paciência no trabalho durante a fase final do curso.

A realização desse projeto de pesquisa só foi possível através das parcerias realizadas. Dentre essas, agradeço aos laboratórios Cedisa e Microvet, aos professores Luciano Nakazato e Valéria Dutra (UFMT), Jurij Sobestiansky (UFG), Roberto Guedes (UFMG), Andréa Moreno (USP), Geraldo Alberton (UFPR), às Médicas Veterinárias Bárbara P. Mota (UFG) e Eliana Paladino (UFMG), as agroindústrias, frigoríficos e cooperativas de suínos (Aurora, BRF, Seara Marfrig, Pamplona, Excelência, Agra, Coopermutum, Frimesa, Castrolanda, C-Vale, Cooperativa Ouro do Sul, Doux, Cotrijui, Cosuel e Spricigo) pelo apoio técnico e estrutural na colheita de amostras.

Ao programa de Bolsas de Pós-Graduação-REUNI/CAPES pelo auxílio à pesquisa e pelo fornecimento da minha bolsa de estudos.

A todos que de alguma maneira contribuíram para meu aperfeiçoamento e evolução.

Finalmente e não menos importante, aos suínos, no qual tenho um grande respeito e gratidão.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

*Leonardo da Vinci*



## Resumo

*Pasteurella multocida* é um dos principais patógenos envolvidos nas broncopneumonias infecciosas em suínos. Apesar de ser considerada agente secundário à pneumonia enzoótica causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* e por agentes virais como o vírus da influenza suína, há evidências do seu envolvimento como agente primário. Neste contexto, o primeiro estudo desenvolvido teve como objetivo desenvolver um método de reprodução experimental de pneumonia por *P. multocida* A cepa 11246 em suínos infectados com diferentes concentrações de inóculo. Um segundo estudo foi desenvolvido com o objetivo de demonstrar diferenças fenotípicas, moleculares e patogênicas entre cepas de *P. multocida* A isoladas de casos clínicos de pneumonia em granjas comerciais de suínos de vários estados brasileiros. No primeiro experimento os suínos foram desafiados por gotejamento intranasal lento com inóculo de diferentes concentrações de *P. multocida* A cepa 11246 [Grupo (G1):  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml; G2:  $10^7$  UFC/ml; G3:  $10^6$  UFC/ml e G4:  $10^5$  UFC/ml]. Foram utilizados dois suínos por grupo com aproximadamente 100 dias de idade. Neste, todas as concentrações de inóculo demonstraram a capacidade da bactéria em causar doença respiratória grave e septicemia nos animais inoculados. Utilizando-se a mesma metodologia de desafio, com inóculo de  $10^7$  UFC/ml, o segundo estudo, ao desafiar 64 suínos igualmente distribuídos em oito grupos (G1 a G8) com oito diferentes cepas de *P. multocida* A (uma cepa por grupo), os resultados demonstraram a presença de cepas muito patogênicas (G1-11246, G2-11229, G3-16614 e G7-17044); pouco patogênicas (G4-16618 e G5-16972); e apatogênicas (G6-17034 e G8-17078), de acordo com a gravidade das alterações clinico-patológicas desenvolvidas. Na avaliação patológica dos animais desafiados, observaram-se três padrões de lesões distintas, associadas ou não entre si: 1. broncopneumonia fibrinonecrótica cranioventral com pleurite fibrinosa (G1, G3, G7); 2. pleurite difusa uni ou bilateral, associada ou não com pericardite e peritonite (G3, G5, G7) e; 3. pleuropneumonia necrossupurativa focal, geralmente no lobo cardíaco (G1, G2; G3, G4, G7). Na análise genotípica, nos padrões de PFGE obtidos após a macro-restrição com a enzima *ApaI*, as cepas patogênicas (N<sup>os</sup> 11246, 11229, 16614, 16618, 16972 e 17044) foram classificadas no mesmo grupo, com homologia variando de 67,3 a 100%, diferenciando-se das cepas apatogênicas (N<sup>os</sup> 17034 e 17078), que pertenceram a outro grupo, com homologia de apenas 52,7% com as demais amostras. Coletivamente, os resultados demonstraram padrões distintos de patogenicidade de diferentes cepas de *P. multocida*, os quais podem estar

associados à características genéticas das cepas. Adicionalmente o estudo demonstrou a atuação primária de algumas cepas de *P. multocida* em pneumonias, pleurites e septicemias em suínos.

**Palavras Chaves:** *Pasteurella multocida*, patogenicidade, modelo de infecção, suínos.

## Abstract

*Pasteurella multocida* is one of the main pathogens involved in infectious bronchopneumonia in swine. Although considered a secondary agent to the enzootic pneumonia caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* and viral agents as the swine influenza, there are evidences related to its involvement as a primary agent. In this context, the first study undertaken aimed at developing an experimental reproduction method of pneumonia caused by *P. multocida* A Strain 11246 in swine infected with different inoculum concentrations. A second study was conducted aiming demonstrating phenotypic, molecular and pathogenic differences between the strains of *P. multocida* A isolated from clinical cases of pneumonia in commercial swine farms in several Brazilian states. In the first experiment, swine were challenged by slow intranasal drip with different inoculum concentrations of *P. multocida* A strain 11246 [Group (G1):  $10^8$  Colony Forming Units (CFU)/ml; G2:  $10^7$  CFU/ml; G3:  $10^6$  CFU/ml and G4:  $10^5$  CFU/ml]. Two swine per group with approximately 100 days of age were used. In these animals all inoculum concentrations demonstrated the bacteria capability to cause severe respiratory disease and septicemia in the inoculated animals. Using the same challenge methodology inoculating  $10^7$  CFU/ml at the second study when challenging 64 swine equally distributed into eight groups (G1 to G8) with eight different strains of *P. multocida* A (one strain per group) results showed the presence of highly pathogenic strains (G1-11246, G2-11229, G3-16614 e G7-17044); less pathogenic (G4-16618 e G5-16972); and apathogenic (G6-17034 e G8-17078), according to the severity of the clinical and pathological alterations developed. In the pathologic evaluation of challenged animals, we observed three distinct patterns of injuries associated or not with each other: 1. Cranioventral fibrinonecrotic bronchopneumonia with fibrinous pleuritis (G1, G3, G7); 2. Difuse uni or bilateral pleuritis pleuritis, associated or not with pericarditis and peritonitis (G3, G5, G7) and; 3. Necrosuppurative focal pleuropneumonia, generally in the cardiac lobe (G1, G2, G3, G4, G7). In genotypic analysis, the PFGE patterns obtained after the macro-restriction with ApaI enzyme, the pathogenic strains (# 11246, 11229, 16614, 16618, 16972 and 17044) were classified in the same group, with homology ranging from 67.3 to 100%, differing from the apathogenic strains (# 17034 and 17078), which belonged to another group, with only 52.7% homology with the other samples. Collectively, the results showed distinct patterns in different pathogenic strains of *P. multocida*, which may be associated with the genetic

features of the strains. Additionally, the reasearch demonstrated the primary role of some strains of *P. multocida* in pneumonia, pleuritis and septicemia in swine.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*, pathogenicity, infeccion model, pigs.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>TABELA 1:</b> Patógenos comumente reconhecido de maior ou menor importância para a indústria de suínos com base em sua capacidade de induzir doenças respiratórias e lesões primárias (maior relevância) ou em co-infecções (menor relevância) (OPRIESSNIG et al., 2011 adaptado).....	23
<b>TABELA 2:</b> Reconhecimento atual do gênero <i>Pasteurella</i> , predileção de hospedeiro e doenças .....	31
<b>TABELA 3:</b> Genes associados à virulência de <i>Pasteurella multocida</i> .....	37

### CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

<b>TABLE 1:</b> Number of pigs in each of four groups with macroscopic after intranasal challenge with <i>P. multocida</i> A strain 11246.....	68
<b>TABLE 2:</b> Number of pigs in each of four groups testing positive for <i>P. multocida</i> in bacteriological (BAC) and immunohistochemistry (IHC) tests following intra-nasal challenge with <i>P. multocida</i> A strain 11246.....	73

### CAPÍTULO III – SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

<b>TABELA 1:</b> Testes laboratoriais realizados em monitorias semestrais nos suínos do rebanho de origens dos animais experimentais utilizados no presente estudo, localizado na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina.....	87
<b>TABELA 2:</b> Isolados de <i>Pasteurella multocida</i> A utilizados no desafio dos animais, obtidos de suínos na fase de terminação com 5 – 6 meses de idade.....	88
<b>TABELA 3:</b> Sequência, especificidade e condições das PCR aplicadas na detecção de genes associados à virulência nos isolados de <i>P. multocida</i> utilizados no desafio dos animais.....	94
<b>TABELA 4:</b> Percentagens de suínos com recuperação de <i>Pasteurella multocida</i> A em função do grupo.....	100

<b>TABELA 5:</b> Percentagens de suínos com recuperação de <i>Pasteurella multocida</i> A em função do grupo.....	106
---	-----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

- FIGURE 1:** Rectal body temperature (RT) of pigs inoculated with *Pasteurella multocida* A, Group 1:  $10^8$  CFU (Colony Forming Unit) Group 2:  $10^7$  CFU; Group 3:  $10^6$  CFU; Group 4: $10^5$  CFU, A: first daily clinical evaluation (8-9 am), B: second daily clinical evaluation (4-5 pm)..... 67
- FIGURE 2:** Right lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *Pasteurella multocida* type A. Cranioventral suppurative bronchopneumonia with focally extensive fibrinous pleuritis (arrows)..... 69
- FIGURE 3:** Left lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *Pasteurella multocida* type A. Diffuse fibrinous pleuritis ..... 69
- FIGURE 4:** Pericardium sac and heart, pig 140 (group 3) inoculated with  $10^6$  CFU of *Pasteurella multocida* type A. Diffuse fibrinous pericarditis ..... 69
- FIGURE 5:** Abdominal cavity, pig 143 (group 4) inoculated with  $10^5$  CFU of *Pasteurella multocida* type A. Diffuse fibrinous peritonitis..... 69
- FIGURE 6:** Lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *Pasteurella multocida* type A. The pleura is thickened with a layer of fibrin, abundant neutrophils and necrotic debris. The underlying pulmonary parenchyma is atelectatic. HE. Bar, 100  $\mu$ m;..... 72
- FIGURE 7:** Lung, pig 131 (group 1) inoculated with  $10^8$  colony forming units (CFU) of *P. multocida* type A. Suppurative bronchopneumonia with focally extensive area of coagulative necrosis within the pulmonary parenchyma (\*). The edges of the necrotic area contain a rim of degenerated inflammatory cells, mainly neutrophils. HE, Bar 100  $\mu$ m. **Inset:** a vessel is plugged with fibrin (fibrin thrombus); the interlobular septa is expanded by fibrin, and the alveoli are filled with neutrophils. HE. Bar 20  $\mu$ m..... 72

**FIGURE 8:** Liver, pig 135 (group 1) inoculated with  $10^8$  colony forming units (CFU) of *P. multocida* type A. Focus of coagulative necrosis in the liver associated with a thrombus (**arrow**). HE. Bar, 50  $\mu$ m. **Inset:** Focal aggregate of *P. multocida* antigen within necrotic focus. Bar, 20  $\mu$ m. Immunohistochemistry, labelled streptavidin biotin (LSAB) method with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) substrate, Mayer's haematoxylin counterstain..... 72

**FIGURE 9:** Lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *P. multocida* type A. Abundant labelling of *P. multocida* antigen in the necrotic pulmonary parenchyma. Bar, 50  $\mu$ m. **Inset:** Distinct labelling of antigen free *P. multocida* and within the cytoplasm of neutrophils and macrophages. Bar, 5  $\mu$ m. Immunohistochemistry, labelled streptavidin biotin (LSAB) method with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) substrate, Mayer's haematoxylin counterstain..... 72

### CAPÍTULO III – SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

**FIGURA 1:** Cavidade torácica, suíno 378 (grupo 7) inoculado com a cepa 17044 de *Pasteurella multocida* A. Pleurite e pericardite (\*) fibrinosas difusas..... 102

**FIGURA 2:** Pulmão, suíno 296 (grupo 5) inoculado com a cepa 16972 de *Pasteurella multocida* A. Pleurite fibrinosa focal (seta) na região dorso-caudal do lobo diafragmático esquerdo..... 102

**FIGURA 3:** Pulmão, suíno 190 (grupo 2) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Pleuropneumonia hemorrágica focalmente extensa no lobo cardíaco direito..... 102

**FIGURA 4:** Coração, suíno 212 (grupo 3) inoculado com a cepa 16614 de *Pasteurella multocida* A. Pericardite fibrinosa difusa..... 102

**FIGURA 5:** Cavidade Abdominal, suíno 212 (grupo 3) inoculado com a cepa 16614 de *Pasteurella multocida* A. Peritonite fibrinosa..... 102

**FIGURA 6:** Baço, suíno 285 (grupo 5) inoculado com a cepa 16972 de *Pasteurella multocida* A. Múltiplos infartos esplênicos com filetes de fibrina sobre a cápsula ..... 102



- FIGURA 7:** Pulmão, suíno 190 (grupo 2) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Área de necrose de coagulação no parênquima pulmonar (\*), circundada por abundantes células inflamatórias, discreta proliferação de tecido conjuntivo (**seta grossa**) e conteúdo muco purulento no bronquíolo (**seta fina**). HE. Bar, 100 µm..... 104
- FIGURA 8:** Pulmão, suíno 190 (grupo 2) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Abundante marcação de antígeno de *P. multocida* (**marcação de cor vermelha**) na área de necrose de coagulação no pulmão e entre as células inflamatórias degeneradas. Bar, 50 µm. **Inset:** Região da necrose de coagulação no pulmão com marcação de antígeno de *P. multocida* (**pontos vermelhos**) no citoplasma de células fagocitárias. Bar, 5 µm. Imuno-histoquímica, método da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB™) com o substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) e contra coloração pela Hematoxilina de Mayer's..... 104
- FIGURA 9:** Pulmão, suíno (190) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Abundante exsudação inflamatória, predominantemente supurativa, intralveolar, em área de necrose de coagulação no parênquima pulmonar. HE. Bar, 10 µm..... 104
- FIGURA 10:** Baço, suíno (grupo 5) inoculado com a cepa 16972 de *Pasteurella multocida* A. Abundante marcação de antígeno de *P. multocida* (**marcação de cor vermelha**) em área de necrose. Bar, 20 µm. Imuno-histoquímica, método da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB™) com o substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) e contra coloração pela Hematoxilina de Mayer's..... 104
- FIGURA 11:** Padrões gerados pela macrorestrição pela *ApaI* visualizados por eletroforese em campo pulsado (PFGE - pulsedfield gel electrophoresis) de oito cepas de *Pasteurella multocida* A [11246 (G1); 11229 (G1); 16614 (G1); 16618 (G1); 16972 (G1); 17034 (G1); 17044 (G1) e 17078(G1)] utilizadas no desafio experimental em suínos..... 108

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
1. Introdução.....	19
2. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA .....	22
1. Introdução.....	22
2. <i>Pasteurella multocida</i> .....	26
2.1. Característica Etiológica .....	27
2.2. Patogenia.....	28
2.3. Fatores de Virulência.....	32
2.3.1. Cápsula bacteriana .....	32
2.3.2. Lipopolissacarídeo (LPS).....	35
2.3.3. Outros fatores associados à virulência de <i>P. multocida</i> .....	36
2.4. Genotipagem.....	40
2.5. Reprodução experimental de pneumonia por <i>P. multocida</i> .....	42
2.6. Diagnóstico.....	44
3. Conclusões.....	45
Referências Bibliográficas .....	47
3. CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO.....	60
<i>Pasteurella multocida</i> A as the primary agent of pneumonia and septicemia in pigs.....	60
Abstract.....	60
1. Introduction .....	61
2. Materials and Methods.....	61
2.1. Ethics statement.....	61
2.2. Animal houses .....	62
2.3. Bacteria culture and inoculum .....	62
2.4. Study design .....	63
2.5. Necropsy and sampling .....	64
2.6. Histopathology and Immunohistochemistry (IHC).....	64
2.7. Microbiology .....	65
2.8. Other pathogens .....	65
2.9. Statistics .....	66
3. Results .....	66

3.1.	Clinical signs .....	66
3.2.	Gross pathology.....	67
3.3.	Histopathology .....	69
3.4.	Recovery of <i>P. multocida</i> .....	70
3.5.	IHC .....	70
4.	Discussion.....	74
	Acknowledgements.....	78
	References.....	79
4.	CAPÍTULO 3 – SEGUNDO ARTIGO.....	84
	Diferentes perfis de patogenicidade entre isolados de <i>Pasteurella multocida</i> A na reprodução experimental de pneumonia e pleurite em suínos .....	84
	Resumo.....	84
1.	Introdução.....	85
2.	Materiais e Métodos .....	85
	Animais.....	86
	Alojamento dos animais.....	86
	Cepas bacterianas .....	86
	Preparo do inóculo .....	87
	Delineamento experimental .....	88
	Necropsia e amostragem .....	89
	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) .....	89
	Isolamento e identificação de <i>P. multocida</i> .....	90
	Tipificação de <i>P. multocida</i> .....	90
	Análise de PCR e gel de eletroforese .....	91
	PFGE .....	92
	Análise estatística.....	93
2.	Resultados.....	98
	Sinais Clínicos .....	98
	Lesões.....	100
	IHQ.....	103
	Recuperação de <i>Pasteurella multocida</i> .....	105
	Tipificação de <i>Pasteurella multocida</i> .....	107
	Caracterização fenotípica.....	107
	Caracterização genotípica .....	107

PFGE .....	107
3. Discussão .....	108
Agradecimentos .....	114
Referência Bibliográfica .....	115
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120

## 1. Introdução

Na década de 70, a suinocultura brasileira iniciou um processo de industrialização, com aumento significativo da produção, onde os animais são alojados em condições intensivas e com alta densidade geográfica. Assim, no Brasil se tornaram comuns formas de produção envolvendo a mistura de leitões de diferentes origens. Fatores como esse facilitaram a transmissão de agentes patogênicos entre rebanhos e, conseqüentemente, houve aumento da ocorrência de doenças causadas por agentes infecciosos até então sem muita importância (CHRISTENSEN, 1981; MOUSING et al., 1990; HURNIK et al., 1994; REGISTER, 2012). As principais enfermidades de causa infecciosa que afetam rebanhos de suínos são as doenças respiratórias e entéricas. Em 1987, em rebanhos da região sul do Brasil, a prevalência de pneumonia em suínos de abate foi estimada em 55,3% (1.983/3.588) e, na época, foi estimada uma perda de 2,4% dos suínos abatidos em decorrência de pneumonias (SOBESTIANSKY et al., 1987). Em 1991, suínos de terminação de um rebanho com ganho de peso inferior a 10% da média dos demais animais, tinham maior possibilidade de serem portadores de doenças respiratórias crônicas. Ainda, o índice de perda de peso por doença respiratória, quando comparado com animais sem lesão no pulmão e pleura, varia de 1,93% a 14,7%, dependendo da extensão das lesões (SONCINI & MORES, 1991). Piffer e Brito (1993) estimaram uma perda de 37,4g/dia no ganho de peso para cada 10% de área de consolidação pulmonar.

Dentre os agentes bacterianos envolvidos nas pneumonias, *Pasteurella multocida* é considerada como um dos principais agentes infecciosos com prevalência elevada ao longo do tempo. No Brasil, Stepan (1995) encontrou 43% das amostras positivas para *P. multocida* pelo isolamento bacteriano em lesões de pneumonia e pleurite de suínos abatidos no Estado do Rio Grande do Sul. Morés (2006) isolou a bactéria em 51,3% das amostras das lesões pneumônicas responsáveis por desvio de carcaças pelo serviço de inspeção sanitária de Santa Catarina. Abilleira et al., (2007) encontrou resultados semelhantes, no qual *P. multocida* foi isolado em 49,59% (61/123), sendo 72,13% (44/61) *P. multocida* sorotipo A, pulmões aderidos na carcaça de suínos abatidos. ACom base nos dados de prevalência de lesões de pulmão e pleura verificadas em suínos abatidos no período de 2002 - 2006 em 10 estados brasileiros (SILVA et. al. 2006); no impacto que tais lesões ocasionam sobre o desempenho dos suínos (PIFFER et. al., 1985) e nos dados do Serviço de Inspeção Federal (SIF) sobre

condenações de carcaça suínas por pneumonia e pleurisia/aderências do abate brasileiro de 2006-2008, estima-se que as perdas econômicas na cadeia produtiva da carne suína com pneumonia, pleurisia e aderência sejam de R\$216 milhões anuais. Isto ocorre em função da redução de ganho de peso e aumento da conversão alimentar nos rebanhos suínos, que deve ter atingido aproximadamente 19,5 milhões de cabeças em 2009, bem como na condenação de carcaças no abate que atingiu 736 mil cabeças neste mesmo ano. Estipulando-se que *P. multocida* seja responsável por um quinto dos casos de pneumonia, pleurisia e aderência, estima-se que o impacto econômico deste agente na cadeia produtiva da carne suína seja de aproximadamente R\$ 43 milhões anuais. Atualmente isso se confirma nos mapas de apreensão/condenações de carcaças pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) dos abatedouros, em que as pleurites e as broncopneumonias aparecem como principais causas de apreensão/condenações (MORÉS, 2013 – observações pessoais).

Por muito tempo, *P. multocida* foi considerada apenas como agente secundário na pneumonia enzoótica, sugerindo que tais amostras atuassem mais como oportunistas do que como patógeno primário (HANSEN et al., 2010). Todavia, associação entre lesões de pneumonias e *P. multocida* tem sido verificada tanto em surtos de campo (CAPPUCCIO et al., 2004) como em condições experimentais (ONO et al., 2003; KICH et al., 2007). No Brasil, estudo preliminar com algumas dessas amostras de *P. multocida* sorotipo A isoladas de casos clínicos de campo, quando inoculadas em suínos SPF (*Specific Pathogens Free*) foram capazes de induzir lesões acentuadas de pleurite, pericardite e/ou lesões pneumônicas semelhantes às induzidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, do tipo A. *pleuropneumoniae-like*, sem nenhum cofator infeccioso ou não associado (KICH et al., 2007). Segundo alguns autores (BETHE et al., 2009) é possível que algumas amostras de *P. multocida* possam refletir uma evolução recente da bactéria no próprio suíno ou uma seleção natural por transferência horizontal de genes *toxA* ou *pfhaB*. Veterinários de agroindústrias que atuam na clínica suína constantemente argumentam sobre a necessidade de estudar melhor as amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos nos rebanhos brasileiros, devido à dificuldade de controle dos surtos onde ela está envolvida. Pode-se afirmar que ainda faltam estudos para um perfeito entendimento do papel desse agente nas lesões pulmonares nos suínos, sendo que já foi determinada a presença de amostras de elevada patogenia nos rebanhos brasileiros (KICH et al., 2007). Tendo em vista a importância da *P. multocida* em doenças respiratórias de suínos e ao pouco conhecimento sobre seu papel na patogenia dessas doenças, o presente estudo teve como objetivo elucidar melhor a atuação dessa bactéria em

alterações pneumônicas e pleurisas, e suas características intrínsecas associadas a tais patologias. Para isto, o presente trabalho foi composto por três capítulos, sendo o primeiro uma revisão de literatura, com os fatores mais relevantes de *P. multocida* associada às doenças respiratórias em suínos. O segundo capítulo é referente ao desenvolvimento de um método de reprodução experimental de pneumonia em suínos SPF, estudando a atuação de uma cepa de *P. multocida* A como agente primário e a caracterização patológica desenvolvida. Finalmente, o terceiro capítulo é referente ao estudo das características patológicas, fenotípicas e moleculares de oito diferentes isolados de *P. multocida* A como causa primária de pneumonia e pleurites em suínos SPF.

## 2. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

### *Pasteurella multocida* associada à pneumonia em suínos

#### 1. Introdução

Infecções respiratórias são comuns e importantes para suínos na fase de crescimento e engorda, resultando em perdas econômicas substanciais e afetam negativamente o bem-estar animal (SØRENSEN et al., 2006). As doenças respiratórias em suínos de criação intensiva são de etiologia complexa, resultado da interação de eventos, incluindo: o hospedeiro (idade, genética e estado imunológico), agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos), ambiente (umidade, temperatura e concentração de amônia) e fatores gerenciais (densidade, mistura de animais de diferentes origens, qualidade do ar, nutrição e estresse) (STÄRK, 2000; CLEVELAND-NIELSEN et al., 2002; REGISTER, 2012; LÓPEZ, 2007; HANSEN et al., 2010). Assim, não se deve considerar apenas um agente infeccioso específico no diagnóstico das doenças respiratórias, mas também outros fatores de risco relevantes (REGISTER, 2012).

Os patógenos respiratórios podem ser divididos em primários, capazes de induzirem lesões severas nos tecidos respiratórios como resultado da sua própria virulência, e patógenos secundários ou oportunistas, que normalmente necessitam do auxílio de outro patógeno co-infectantes ou cofatores não infecciosos para produzir lesões significativas no sistema respiratório (OPRIESSNIG et al., 2011). De maneira geral, agentes virais como o vírus influenza A e *M. hyopneumoniae* normalmente atuam como agentes primários, prejudicando os mecanismos de defesa do hospedeiro, permitindo a invasão de agentes de infecções secundárias, geralmente bactérias oportunistas (SØRENSEN et al., 2006). Além disso, Opriessnig et al., (2011) classificou os patógenos respiratórios de acordo com sua relevância na indústria de suínos, existindo variações de acordo com a região ou população, podendo ser divididos em patógenos de maior e menor importância ou relevância (**Tabela 1**). A prevalência e gravidade das doenças respiratórias podem ser agravadas por um determinado patógeno ou fator de risco. Este aumento é quantificado através da relação da incidência da doença entre os animais expostos e não expostos ao determinado fator de risco, seja ele



infeccioso ou não infeccioso. Ainda, quando ocorre a associação simultânea entre dois ou mais fatores de risco, o risco relativo total, muitas vezes, é maior do que o risco de fatores individuais (MOUSING et al. 1990)

**Tabela 1:** Patógenos comumente reconhecido de maior ou menor importância para a indústria de suínos com base em sua capacidade de induzir doenças respiratórias e lesões primárias (maior relevância) ou em co-infecções (menor relevância) (OPRIESSNIG et al., 2011 adaptado).

	<b>Patógeno</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Maior Relevância</b>	<b>Menor Relevância</b>
	Circovírus suíno tipo 2	PCV2		X
	Citomegalovírus suíno	PCMV		X
Vírus	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos	PRRS	X	
	Coronavírus respiratório dos suínos	PRCV		X
	Vírus da Pseudorraiva	PRV	X	
	Vírus da influenza suína	SIV	X	
Bactérias	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	APP	X	
	<i>Actinobacillus suis</i>	ASUIS	X	
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	APYO		X
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	BORD	X	
	<i>Haemophilus parasuis</i>	HPS		X
	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	MHYO	X	
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	MHYOR		X
	<i>Pasteurella multocida</i>	PMULT		X
	<i>Salmonella</i> spp.	SALM	X	
	<i>Streptococcus suis</i>	SSUIS		X

Devido a esses fatores, o termo “Complexo de Doença Respiratória do Suíno” (CDRS) tem sido muito utilizado. Thacker, (2006) define este complexo como um problema respiratório multifatorial envolvendo infecções mistas com *Mycoplasma* spp, vírus respiratórios e bactérias oportunistas associados a fatores não infecciosos (ambiente e manejo). Outros autores não especificam os agentes envolvidos, consideram apenas como um complexo respiratório que envolve diversos patógenos (KIM et al., 2003; OPRIESSNIG et al.,

2007). De forma geral, o CDRS afeta suínos em fase de terminação de 14 a 22 semanas de idade (THACKER, 2001; KIM et al., 2003) com morbidade entre 10% a 40% e mortalidade de 2% a 20% (HARDING & HALBUR, 2002; HARMS et al., 2002). As lesões são localizadas principalmente na porção crânio-ventral do pulmão, caracterizada por áreas de consolidações associado ou não à pleurite e pericardite, alterações de coloração e insuficiência do tecido pulmonar colapsado (HARMS et al., 2002; JIRAWATTANAPONG et al., 2010). Alterações histopatológicas podem variar de acordo com os agentes envolvidos, mas broncopneumonia, associada ou não com pneumonia intersticial, tem sido frequentemente relatada (HARMS et al., 2002; KIM et al., 2003).

Muito dos patógenos envolvidos no CDRS são ubíquos e, comumente, há a presença de múltiplos agentes infecciosos em um mesmo rebanho ao mesmo tempo. A entrada de novos microorganismos na granja se dá através de aerossóis, fômites, vetores e, principalmente, através da entrada de animais portadores (OPRIESSNIG et al., 2011; REGISTER, 2012). Dos agentes etiológicos envolvidos no CDRS, os agentes virais são conhecidos como predisponente para ocorrência de pneumonia bacteriana secundária, o que é conhecido como sinergismo viral-bacteriano (LÓPEZ, 2007). Dentre os principais agentes virais envolvidos, estão inclusos circovírus suíno tipo 2, PCV2 (KIM et al. 2003; OPRIESSNIG et al., 2007), vírus influenza suína, SIV (SCHNITZLER & SCHNITZLER, 2009), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória do suíno, PRRS (PIETRO e CASTRO, 2005) e Coronavírus respiratório, PRCV (OPRIESSNIG et al., 2011), sendo que os dois últimos (PRRS e PRCV) ainda não foram diagnosticados no Brasil (CIACCI-ZANELLA et al., 2004; CIACCI-ZANELLA et al., 2013).

Entre os agentes bacterianos, *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* são os mais comumente encontrados em lesões pulmonares (HØIE et al., 1991; MORES, 2006; JIRAWATTANAPONG et al., 2010; PALADINO, 2012;), embora outras bactérias também possam ser isoladas, tais como *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus* spp. e *Treperella pyogenes* (antigamente denominada de *Arcanobacterium pyogenes*; MORRISON et al., 1985, FALK et al., 1991, HØIE et al., 1991, WALLWITZ DE ARAÚJO, 1994). Como já mencionado, *P. multocida* é um dos agentes bacterianos mais comumente isolados de lesões de pneumonia em suínos (FALK et al., 1991; HØIE et al, 1991; CHOI et al., 2003). Além de atuar como agente secundário em broncopneumonia, *P. multocida* está associada a pleurites, pericardites e septicemias (PIJOAN & FUENTES, 1987; ONO et al., 2003; PORS et al., 2011) e pneumonia necro-

hemorrágica, similar à causada pelo *A. pleuropneumoniae* (“*A. pleuropneumoniae-like*”) (CAPPUCCIO et al., 2004). Apesar de ser considerada como agente secundário à pneumonia enzoótica causada pelo *M. hyopneumoniae* (PIJOAN & FUENTES, 1987; HANSEN et al., 2010), há evidências que demonstram o seu envolvimento como agente primário (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003; KICH et al., 2007). No entanto, a atuação primária de *P. multocida* em pneumonia ainda é muito questionável, principalmente pela dificuldade em reproduzir a doença na ausência de cofatores de infecção, sejam eles infecciosos ou não infecciosos (ROSS, 2007). Poucos trabalhos tiveram sucesso na reprodução de pneumonias, pleurisias e septicemias através de desafios pela via intra nasal com repetidas doses de *P. multocida* e pela via intratraqueal (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003). Ainda, é possível que a alta diversidade genética entre isolados de *P. multocida* associados a doenças respiratórias de suínos possa influenciar na patogenicidade do agente (MORENO et al., 2003; MAROIS et al., 2009; PORS et al., 2011).

A prevalência de *P. multocida* nas lesões pneumônicas em suínos tem se mantido alta nos estudos realizados ao longo do tempo. No Brasil, Stepan (1995) encontrou 43% das amostras positivas analisando lesões de pneumonia e pleurite no Estado do Rio Grande do Sul. Morés (2006) estudou lesões responsáveis por desvio de carcaças pelo serviço de inspeção sanitária em Santa Catarina e encontrou *P. multocida* como o principal agente, sendo isolada em 51,3% das amostras. Trabalhos realizados em outros países também demonstram a alta prevalência do agente, como os resultados obtidos por Falk et al. (1991) e Høie et al. (1991), que ao analisar rebanhos da Noruega, encontraram prevalências de 43 e 54% em lesões de pneumonia enzoótica e pleuropneumonia, respectivamente. Em outro trabalho realizado na Dinamarca, Hansen et al. (2010) encontraram uma prevalência de 79% de *P. multocida* em 148 pulmões de suínos abatidos com lesões de broncopneumonia cranioventral.

Em 2010, foi realizado um levantamento laboratorial de 133 casos de suínos com sinais clínicos de doenças respiratórias em criações do sul do Brasil (MORÉS et al., 2011). Nesse estudo, 79% (105/133) dos casos eram sugestivos de associação entre dois ou mais agentes infecciosos, sendo *M. hyopneumoniae* e o vírus da influenza suína A os principais agentes envolvidos. No mesmo estudo, 87 amostras encaminhadas ao exame bacteriológico apresentaram crescimento bacteriano em 46% (40/87), sendo *P. multocida* mais frequente com prevalência de 22%. Outro estudo realizado em cinco estados brasileiros (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) observou uma prevalência de 65% de *P. multocida* A em 86 pulmões com broncopneumonias de suínos abatidos

(MORÉS et al., 2013a) e de 53,7% em 80 suínos com sinais clínicos de doença respiratória (MORÉS et al., 2013b). Nesses dois estudos, a principal associação foi de *P. multocida* com *M. hyopneumoniae*, com ocorrência de 50,5% nas amostras de frigorífico (MORÉS et al., 2013a) e de 38% dos animais com sinais clínicos (MORÉS et al., 2013b).

Tendo em vista a importância de *P. multocida* em lesões pulmonares de suínos na fase de crescimento e terminação, esta revisão de literatura tem como objetivo apresentar os fatores mais relevantes dessa bactéria associada às lesões de pneumonias em suínos, analisando seu papel secundário e primário, etiologia e como realizar o diagnóstico da doença.

## 2. *Pasteurella multocida*

*Pasteurella* foi primeiramente identificada como causa de cólera aviária por Louis Pasteur em 1887. O pesquisador demonstrou, através de passagens repetidas da bactéria, que amostras de *P. multocida* se tornavam atenuadas e incapazes de causar doenças em aves. No entanto, ao inocular essas amostras, ocorreu uma resposta imune protetora em aves (PASTEUR, 1880, 1881). *Pasteurella* pertence à família *Pasteurellaceae*, no qual estão inseridos outros gêneros que também são responsáveis por doenças respiratórias em suínos, tais como o *Actinobacillus* e *Haemophilus* (QUINN et al., 2011). De acordo com a lista de nomes de procarióticos com o *standing* em nomenclatura, disponível em <http://www.bacterio.net/index.html>, existem 23 espécies do gênero *Pasteurella*, sendo elas: *P. aerogenes*, *P. anatis*, *P. avium*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. gallicida*, *P. gallinarum*, *P. granulomatis*, *P. langaaensis*, *P. haemolytica* (atualmente denominada de *Mannheimia haemolytica*), *P. lymphangitidis*, *P. mairii*, *P. multocida*, *P. oralis*, *P. pneumotropica*, *P. skyensis*, *P. stomatis*, *P. testudinis*, *P. trehalosi*, *P. ureae* e *P. volatium*. Ainda, *P. multocida* contém quatro subespécies, *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *gallicida*, *P. multocida* subsp. *septica* e *P. multocida* subsp. *tigres* (MUTTERS et al., 1985; CAPITINI et al. 2002; REGISTER et al., 2012). Dessas, as espécies consideradas como potencialmente patogênicas são: *P. multocida* subsp. *multocida* (pneumonia, cólera aviária, rinite atrófica, septicemia hemorrágica); *P. multocida* subsp. *gallicida* (cólera aviária); *P. multocida* subsp. *septica* (feridas e septicemias); *P. aerogenes*, *P. mairii* (abortos); *P. bettyae* (úlceras e infecções geniturinárias); *P. caballi* (pneumonia e feridas); *P. pneumotropica* e *P. testudinis* (pneumonia) (CHRISTENSEN & BISGAARD, 2008).

Na produção animal, *P. multocida* subsp. *multocida* é a mais importante, sendo responsável por causar doença em um número amplo de espécies de hospedeiros, tais como aves, bovinos, suínos e coelhos (HARPER et al., 2006). Além disso, é importante na saúde pública por ser uma zoonose causada pela mordida e arranhões de cães e gatos, o que acarreta lesões cutâneas, infecções abdominais, meningite, artrite, pneumonia, endocardite e septicemia, principalmente em pacientes imunocomprometidos (WEBER et al., 1984; TALAN et al., 1999; MIYOSHI, et al., 2011; JÜCH et al., 2012; LÓPEZ-CUENCA et al., 2013). Em suínos, *P. multocida* é considerada como microbiota residente do trato respiratório superior dos suínos e pode estar presente em processos pneumônicos e pleurisas, além de determinadas amostras toxigênicas participarem da etiopatogenia da rinite atrófica progressiva em associação com *Bordetella bronchiseptica* (JORDAN et al., 2006; PALZER et al., 2008; BETHE et al., 2009; HERES, 2009; HANSEN et al., 2010; REGISTER, 2012).

## 2.1. Característica Etiológica

*Pasteurella multocida* é um pequeno coco-bacilo Gram-negativo, com o tamanho de 0,5-1 x 1-2µm, anaeróbio facultativo, oxidase e catalase positivo, imóvel e indol positivo (QUINN et al., 2011). É cultivada nos principais meios de enriquecimento com sangue ou soro em aerobiose por 18 a 24 horas a 37°C, no qual se observa o crescimento de colônias de um a três milímetros de diâmetros, com formas lisas e/ou mucoides e, em menor frequência, pode apresentar a forma rugosa (BOROWSKI, 2001; QUINN et al., 2011; REGISTER, 2012). Não apresenta crescimento em ágar Mac Conkey e não requer o fator X e V para o seu crescimento (QUINN et al., 2011; REGISTER, 2012). A bactéria pode ser classificada de acordo com as diferenças presentes nos testes bioquímicos, principalmente em relação à produção de ácido a partir de determinadas pentoses (como xilose e arabinose), dissacarídeos (como maltose e trealose) e álcoois polihídricos (como sorbitol, manitol e dulcitol) (BOROWSKI, 2001; DEVIES, 2004).

Ainda, *P. multocida* pode ser classificada através de métodos sorológicos em cinco grupos capsulares, denominados A, B, D, E e F, sendo os sorotipos A e D os mais frequentes em suínos (QUINN et al., 2011; REGISTER, 2012). A composição e estrutura do material capsular encontrado nos sorotipos capsulares A, D e F são muito similares aos glicosaminoglicanos de mamíferos e consistem principalmente de ácido hialurônico, heparosano e condroitina não sulfatados, respectivamente (PANDIT & SMITH, 1993;

RIMLER, 1994; DeANGELIS, 1996; DeANGELIS & PADGETT-McCUE, 2000). Os genes requeridos para a síntese e transporte desses tipos capsulares são codificados em uma mesma região do genoma (TOWNSEND et al., 2001). Entretanto, recentemente, nos tipos capsulares A, D e F, foi identificado um gene adicional que codifica a síntese do heparosano fora da região de biossíntese capsular conhecida. O produto do gene *hssB* (anteriormente denominado *pgla*) é um polímero de baixo peso e é transcrito 10 vezes menos do que a síntese que ocorre dentro do *operon* capsular. Neste caso, utiliza um receptor diferente. Foi proposto que a expressão desse gene seja responsável pela variação capsular (DEANGELIS & WHITE, 2004).

Além da classificação capsular, *P. multocida* é diferenciada quanto aos antígenos somáticos, ou seja, lipopolissacarídeos (LPS) de membrana. Até o momento, foram identificados 16 sorovares somáticos, denominados de 1-16 (REGISTER, 2012). Dentre os sorotipos capsulares, o sorotipo A tem sido o mais comumente encontrado em lesões pneumônicas em suínos (BOROWSKI et al., 2002; HERES, 2009; REGISTER, 2012). No entanto, há trabalhos que demonstram o aumento no número de isolados do sorotipo D em pneumonias (JORDAN et al., 2006; MORÉS, 2006). Entre os antígenos somáticos, os mais observados em suínos são 3 e 5 (REGISTER, 2012), contudo, são necessários maiores estudos para classificar o agente em casos de suínos com pneumonias.

## 2.2. Patogenia

Atualmente, mesmo com o conhecimento da importância de *P. multocida* na produção animal e também como zoonose, há poucas informações concretas sobre a patogenia da infecção pela bactéria. Nesse sentido, alguns estudos buscaram associar a patogênese com as características moleculares de *P. multocida* (MAROIS et al., 2009; PORS et al., 2011), mas os resultados foram poucos conclusivos em relação ao mecanismo central da infecção. Existe muita dificuldade em reproduzir a doença na ausência de cofatores de infecção, sejam eles infecciosos ou não infecciosos, o que prejudica a comprovação da atuação primária de *P. multocida* em pneumonias em suínos (ROSS, 2007). Poucos trabalhos tiveram sucesso na reprodução de pneumonias, pleurisias e septicemias através de desafios pela via intra-nasal com repetidas doses de *P. multocida* e pela via intratraqueal (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003). É possível que a alta diversidade genética entre isolados de *P. multocida* associados a doenças respiratórias de suínos possa influenciar na patogenicidade do agente

(MORENO et al., 2003; MAROIS et al., 2009; PORS et al., 2011). O conhecimento limitado da patogenia de *P. multocida* em lesões de pneumonias em suínos, bem como a dificuldade de reprodução experimental da doença, tendo *P. multocida* sorotipo A como agente primário de infecção, tem como consequência o insucesso no estudo e desenvolvimento de vacinas para o controle, bem como outros tratamentos profiláticos.

O fator de virulência de *P. multocida* que contribui para o desenvolvimento de pneumonias em suínos é desconhecido e pode variar dependendo do número e identidade dos agentes presentes no pulmão. Co-infecções com outros agentes de doenças respiratórias é o fator mais significativo a contribuir para a ocorrência da pasteurelose pneumônica. Os agentes, importantes incluem *M. hyopneumoniae* (AMASS et al., 1994; CIPRIÁN et al., 1994; PIJOAN & FUENTES 1987; HANSEN et al., 2010; PALADINO, 2012) e o vírus da pseudorraiva (PIJOAN & FUENTES 1987). A co-infecção com *A. pleuropneumoniae* permite a colonização no pulmão por *P. multocida*, através da interferência na habilidade dos macrófagos alveolares em fagocitar e matar as bactérias (CHUNG et al., 1993). Assim como *M. hyopneumoniae*, o vírus influenza suína é considerado como um dos agentes primários de grande relevância no CDRS. O vírus causa a destruição do aparelho mucociliar respiratório, caracterizada por bronquiolite e bronquite necrotizante, consequentemente predispõe à infecção por bactérias e potencializa a doença respiratória causada por outros agentes infecciosos (OPRIESSNIG et al., 2011). Outro vírus importante na ocorrência de doenças respiratórias é o PCV2 que tem sido associado com pneumonia intersticial e pode induzir a atenuação e ulceração do epitélio das vias aéreas e causar proeminente fibroplasia peribronquiolar e peribronquial (KIM et al., 2003). Antígeno de PCV2 tem sido demonstrado no citoplasma de macrófagos pulmonares, no epitélio bronquiolar e nas células endoteliais, o que sugere que o vírus pode contribuir na gravidade e duração da pneumonia (HARMS et al., 2002). Em granjas que estejam usando um programa de vacinação eficiente para o controle do vírus há diminuição da incidência de doenças respiratórias e co-infecções (FACHINGER et al., 2008). Além dos vírus citados, o vírus da PPRS, mesmo que não tenha sido diagnosticado no Brasil (CIACCI-ZANELLA et al., 2013), é importante na rota do CDRS por induzir a lise celular, apoptose, alterar as funções dos macrófagos alveolares e intravasculares, danificar a defesa mucociliar e alterar a subpopulação de células T causando imunossupressão, facilitando assim as infecções secundárias (OPRIESSNIG et al., 2011).

Um amplo número de genes associados à virulência tem sido encontrado em diversos isolados de *P. multocida* (EWERS et al., 2006; TANG et al., 2009; FERREIRA et al., 2012;

VARGAS et al., 2013), no entanto, ainda é desconhecida a sua real contribuição na patogenia da bactéria. É provável que existam diferenças significativas entre a patogênese de cada doença causada por *P. multocida* devido aos diferentes sorotipos capsulares e somáticos da bactéria e à capacidade em infectar e causar doença em um amplo número de hospedeiros (**Tabela 2**). Esta variedade de doenças pode estar associada aos seguintes fatores, associado ou não entre si: adaptação da amostra ao hospedeiro, presença e expressão gênica de determinados fatores associados à virulência e fatores relacionados aos hospedeiros, tais como ecologia, anatomia e imunidade inata (BOYCE et al., 2010).

A maioria das cepas de *P. multocida* atua como comensais e é relativamente inócua ao hospedeiro, podendo manter populações da bactéria na orofaringe por longos períodos (DE ALWIS et al., 1990; MUHAIRWA et al., 2000). No entanto, o principal mecanismo pelo qual a bactéria pode invadir e colonizar o pulmão ou outro tecido é desconhecido. Praticamente qualquer estirpe da bactéria tem o potencial para causar doenças graves, tais como pneumonia e infecções multissistêmicas quando o animal é exposto a determinados cofatores de infecção, tais como má higiene das instalações e insumos de baixa qualidade, superlotação e condições ambientais adversas (ROSS, 2007). Em condições normais de saúde do hospedeiro, é descrito que *P. multocida* não tem a capacidade de atravessar a mucosa epitelial do trato respiratório superior de aves e suínos (WILKIE et al., 2000). No entanto, ao inocular via intratraqueal, a bactéria atinge rapidamente o sistema vascular através do trato respiratório inferior (WILKIE et al., 2000). Normalmente, colonização pulmonar de *P. multocida* é possível através da interação com agente primário de pneumonia como *M. hyopneumoniae* que determina ciliostase e diferentes graus de lesão ao epitélio ciliar (DEBEY & ROSS, 1994). Atualmente, há trabalhos que evidenciam a importância primária de *P. multocida* em lesões de pneumonias em suínos (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003; KICH et al., 2007), no entanto pouco se sabe sobre o fator que explique a diferença de patogenicidade de determinadas cepas da bactéria.

Na cólera aviária e no complexo de doenças respiratória dos bovinos, a rota de infecção não é conhecida, no entanto, evidências apontam o trato respiratório como o principal local de entrada da bactéria. Cepas virulentas de *P. multocida* parecem ser capazes de colonizar a mucosa do trato respiratório superior, de onde infectam os sacos aéreos e pulmões. Por outro mecanismo ainda desconhecido, possivelmente através de macrófagos, *P. multocida* é também capaz de ter acesso à circulação diretamente da mucosa (MATSUMOTO et al., 1991; HASSANIN et al., 1995). Em aves, surto de cólera aviária tem sido associado



com lesões abrasivas na perna das aves com isolamento da bactéria nesse local, caracterizado por um inchaço edematoso, o que sugere outra possibilidade de via de infecção pela bactéria (WILKIE et al., 2012).

Tabela 2: Reconhecimento atual do gênero *Pasteurella*, predileção de hospedeiro e doenças.

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Associação/doenças (sorotipos comuns)</b>
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i> , <i>gallicida</i> , and <i>septica</i>	Pássaros Mamíferos	Cólera Aviária (A; F e raramente D); Pneumonia bovina (A:3) e em suínos; Rinite Atrófica dos Suínos (A e D toxigênica); Septicemia hemorrágica (B:2; B:2,5; E:2 e E:2,15); Mordidas e feridas associado a infecções em humanos.
<i>P. dagmatis</i>	Cães	Microbiota normal em cães. Doença zoonótica;
<i>P. canis</i>	Cães e gatos Bovinos e ovinos?	Microbiota normal em gatos e cães; Mordidas e feridas associado a infecções em humanos; Pneumonia em bovinos e ovinos?
<i>P. stomatis</i>	Cães e gatos.	Mordidas e feridas associado a infecções em humanos;
[ <i>P.</i> <i>aerogenes</i> ] <sup>a</sup>	Suínos	Septicemia, pneumonia e diarreia.
[ <i>P.</i> <i>bettyae</i> ] <sup>a</sup>	Humanos	Infecção geniturinária.
[ <i>P.</i> <i>langaaensis</i> ] <sup>a</sup>	Cavalos e suínos	Infecções respiratórias
[ <i>P.</i> <i>pneumotropica</i> ] <sup>a</sup>	Gatos, cães e roedores	Pneumonias e infecções supurativas em roedores.
[ <i>P.</i> <i>mairii</i> ] <sup>a</sup>	Suínos	Isolados no trato reprodutivo de suínos e associados a abortos.
[ <i>P.</i> <i>skyensis</i> ] <sup>a</sup>	Peixes	Infecções fatais em salmões do Atlântico.
[ <i>P.</i> <i>testudinis</i> ] <sup>a</sup>	Tartarugas	Doenças respiratórias em tartarugas.

<sup>a</sup>Embora essas espécies sejam atualmente denominadas como gênero *Pasteurella*, dados genômicos sugerem que não fazem parte do grupo de *Pasteurella sensu stricto* e que eles vão ser movidos para um novo gênero no futuro (Korczak and Kuhnert, 2008 ).

Fonte: Boyce et al., 2010.

Na hemorragia septicêmica em bovinos, a principal via de infecção parece ser através do tecido tonsilar, no qual a bactéria se multiplica no tecido peritonsilar e os macrófagos podem carrear microorganismos viáveis para os linfonodos locais, onde se multiplicam e disseminam para os demais tecidos (DE ALWIS et al., 1990). Após o acesso de *P. multocida* para tecidos e sangue, pode multiplicar-se no local (infecções de feridas, hemorragias septicêmicas e pneumonias) ou localizar-se temporariamente em órgãos como fígado e baço (aves) de onde pode ter acesso à via sistêmica (RHOADES & RIMLER 1990; BOYCE et al., 2010). O estágio da bacteremia varia de moderada a acentuada, dependendo da cepa envolvida, evoluindo para morte (WILKIE et al., 2012).

Como descrito, pouco se sabe sobre a real associação de determinadas estruturas bacteriana de *P. multocida* envolvidas na patogênese da bactéria. A seguir serão descrito alguns fatores responsáveis pela colonização do hospedeiro, sobrevivência bacteriana e evasão do sistema imune.

## **2.3. Fatores de Virulência**

### *2.3.1. Cápsula bacteriana*

A cápsula bacteriana de *P. multocida* é um polímero de carboidrato e tem sido utilizada para diferenciar as cepas em cinco tipos distintos com base na antigenicidade da cápsula, denominados de sorotipos A, B, D, E e F (CARTER 1967; RIMLER & RHOADES 1987). Destes, os sorotipos B e E tem sido associados a hemorragias septicêmicas em pássaros, bovinos, búfalos e suínos (DE ALWIS, 1992; DAVIES et al., 2003; EWERS et al., 2006); o sorotipo D à rinite atrófica dos suínos (CHANTER et al., 1989; REGISTER et al., 2012) e lesões de pneumonias em suínos (MORÉS, 2006) e; o sorotipo A comumente relacionado à cólera aviária (CHRISTENSEN & BISGAARD, 2000; HARPER et al., 2012) e pneumonias e pleurites em suínos (SMITH et al., 1973a,b, BOROWSKI, 2001; ONO et al., 2003; MORÉS 2006; KICH et al., 2007; HERES, 2009; HANSEN et al., 2010; PALADINO, 2012). Ainda, há descrições de septicemias em suínos causada por *P. multocida* sorotipo A em alguns estudos de infecção experimental (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003) e de infecção natural (PIJOAN & FUENTES, 1987; MACKIE et al., 1992; CAMERON et al., 1996;

BLACKALL et al., 2000; THOMSON et al., 2001; PORS et al., 2011; CARDOSO-TOSET et al., 2013).

O sorotipo capsular A é composto pelo ácido hialurônico e apresenta alta massa molecular e é composto de repetidos polímeros de ácido glucurônico e N-acetil glicosamina, formando assim o maior componente da matriz extracelular (CARTER et al., 1958). Os sorotipos D e F são também compostos de polímeros, porém distintos do sorotipo A. Esta diferença é baseada no perfil de susceptibilidade de hidrólise para enzimas específicas como a heparinase, hialuranidase e condroitinase (PANDIT & SMITH 1993; RIMLER 1994). Os sorotipos B e E são pouco caracterizados, sendo sugerido que o sorotipo B é constituído por N-acetil ácido manosaminurônico. Quanto ao sorotipo E, não há descrição da composição.

A organização genética do locus de biossíntese de todos os cinco sorotipos capsulares apresenta arranjo similar com a região típica de biossíntese capsular do Grupo II de outras bactérias Gram-negativas (CHUNG et al., 1998; BOYCE et al., 2000, 2010; TOWNSEND et al., 2001). De maneira geral, essa organização genética é dividida em três regiões características. Todos os locus contém a região denominada Região 1 e 3; A Região 1 contém quatro genes altamente conservados (*hexABCD* ou *cexABCD*; BOYCE et al., 2010) que codificamos componentes de um sistema de transporte ABC necessário para a exportação e apresentação da cápsula polimérica para a superfície. Da mesma forma, o locus de dois genes (*phyAB* ou *lipAB*) da Região 3, que codifica proteínas necessárias para a ancoragem do polissacarídeo da cápsula para a superfície das células bacterianas, é altamente conservada entre os cinco sorotipos, embora nos sorotipos B e E o locus *lipA* é localizado adjacente à Região 1. A Região 2 determina o sorotipo capsular da bactéria por possuir genes específicos envolvidos na biossíntese de polissacarídios. As proteínas codificadas por essa região catalizam a síntese e montagem do polissacarídeo correspondente (DeANGELIS et al., 1998; BOYCE & ADLER, 2000; KANE et al., 2006).

A cápsula bacteriana desempenha importantes funções para a sobrevivência e patogenicidade da bactéria. Dentre essas funções, resistência à dessecação no ambiente externo é importante para a transmissão do agente entre hospedeiros. Embora não tenha estudos que demonstrem essa função em *P. multocida*, há trabalhos que descrevem que cepas encapsuladas de *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Erwinia stewartii* são mais resistentes ao ressecamento do que cepas acapsulares (OPHIR & GUTNICK, 1994). Outra importante função da cápsula da bactéria é promover a aderência com a superfície da célula do hospedeiro, permitindo assim a colonização. Foi demonstrado que *P. multocida* A adere

fortemente a células HeLa (linhagem celular humana obtido de um câncer cervical), macrófago dos sacos aéreos e alveolares de perus. A redução da aderência bacteriana foi demonstrada através do tratamento das células com hialuronidase (para reduzir a quantidade de cápsula) ou adição de ácido hialurônico. Da mesma forma, variantes acapsulares de *P. multocida* não aderem a macrófagos dos sacos aéreos de perus (PRUIMBOOM et al., 1996). A bactéria também se liga fracamente a monócitos periféricos do sangue de perus e esta interação foi reduzida na presença de ácido hialurônico. Então, tem sido sugerido que a adesão da bactéria a monócitos e macrófagos de perus é mediada pelo ácido hialurônico presente na cápsula bacteriana. O receptor do monócito foi identificado como CD44, uma glicoproteína da superfície celular com a função de interação intercelular, que atua como receptor do ácido hialurônico da matrix extracelular (PRUIMBOOM et al., 1999).

Uma série de estudos tem demonstrado que a cápsula de *P. multocida* interfere na atividade fagocítica do hospedeiro (NOEL et al., 1992; SHIMOJI et al., 1994; THAKKER et al., 1998; SMITH et al., 1999). Cepas capsuladas são geralmente mais resistentes à fagocitose do que as variantes espontâneas não encapsuladas, ou cepas em que a cápsula tenha sido quimicamente removida ou reduzida pelo tratamento com hialuronidase (MAHESWARAN & THIES, 1979; ANDERSON et al., 1984; HARMON et al., 1991; PRUIMBOOM et al., 1996). Ainda, como demonstrado para outras bactérias Gram-negativas, cepas capsuladas de *P. multocida* são altamente resistentes ao sistema complemento e crescem ativamente no soro (SNIPES & HIRSH, 1986; HANSEN & HIRSH, 1989).

Estudos demonstram que a cápsula da bactéria é essencial para a virulência de *P. multocida* e está claramente envolvida na evasão da fagocitose e resistência ao complemento (SNIPES & HIRSH, 1986; TRUSCOTT & HIRSH, 1988; HANSEN & HIRSH, 1989; HARMON et al., 1991; PRUIMBOOM et al., 1996). Tem sido demonstrado que mutantes definidas geneticamente como incapazes de sintetizar e exportar a cápsula para a superfície bacteriana possuem virulência atenuada, ou seja, se tornam amostras de baixa virulência (BOYCE & ADLER, 2000; CHUNG et al., 2001). Isto já foi relatado em outras bactérias (*Vibrio vulnificus*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *A. pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Cryptococcus neoformans*), nas quais cepas mutantes (acapsulares) geneticamente reduziram a virulência quando comparada a cepas selvagens capsulares (MOXON et al., 1984; KROLL et al., 1988; WESSELS et al., 1994; CHANG et al., 1996; THAKKER et al., 1998; ZUPPARDO & SIEBELING, 1998; FAVRE-BONTE et al., 1999; SMITH et al., 1999).

Ao construir um mutante de *P. multocida* sorotipo A:1 (*P. multocida* X-73), através da destruição do gene *hexA* por meio da inserção de cassete de resistência à tetraciclina, Chung et al., (2001) demonstraram que as amostras mutantes foram mais sensíveis à ação bactericida de soro de galinha, enquanto que as cepas selvagens foram resistentes. Ainda, nesse mesmo estudo, após a inoculação via intramuscular das cepas (mutante e selvagem) em galinhas, a contagem de bactérias mutantes (*hexA::tet* (M)) diminuiu de forma significativa, enquanto que a cepa selvagem cresceu rapidamente ao longo de 4 horas. Assim, conclui-se que a cápsula é um determinante essencial para a virulência na patogênese da cólera aviária. Outro estudo demonstrou que cepas mutantes de *P. multocida* sorotipo B:2 acapsulares são avirulentas em camundongos (BOYCE & ADLER, 2001). Neste estudo, foi demonstrado que a imunização de camundongos com cepas vivas acapsulares (mutantes) conferiram proteção significativa contra as cepas selvagens, enquanto a imunização com doses semelhantes de ambas as cepas mortas do tipo selvagem e mutante não conferiu proteção.

### 2.3.2. Lipopolissacarídeo (LPS)

Lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula de grande dimensão constituída de um lipídeo e um polissacarídeo ligados por uma ligação covalente, formando uma barreira hidrofóbica impermeável. De maneira geral, LPS pode ser dividido em três regiões distintas, domínio hidrofóbico lipídico A, uma região de não-repetição interna ou externa de oligossacarídeos, e uma região de antígeno-O, que consiste de oligossacarídeos de repetição (RAETZ & WHITFIELD, 2002). O antígeno LPS é um dos principais componentes da membrana externa das bactérias Gram-negativas e, atualmente, *P. multocida* é classificada em 16 sorovares (HEDDLESTON & REBERS, 1972). Como *P. multocida* não apresenta a região do antígeno-O, a classificação se baseia nas diferentes estruturas do núcleo externo que é o componente mais distal e variável do LPS, sendo o núcleo interno altamente conservado entre as cepas.

O LPS desempenha um papel crucial na patogênese de doenças. Isto foi demonstrado por Fernandez de Henestrosa et al. (1997). Ao produzir cepas mutantes de *P. multocida* para o gene *gale*, inibindo assim a capacidade de sintetizar UDP-galactose, essencial para biossíntese de LPS, transformou as cepas em altamente atenuadas, como visto num ensaio biológico realizado num modelo de rato. No sentido de demonstrar a importância do LPS na patogenia de *P. multocida* na cólera aviária, alguns estudos em ratos e galinhas tem utilizado a

técnica de mutagênese marcada com assinatura (*signature-tagged mutagenesis*) com o objetivo de identificar os possíveis genes alvos capazes de interferir na síntese de LPS e, conseqüentemente, transformar cepas virulentas em atenuadas (FULLER et al., 2000; HARPER et al., 2003; HARPER et al., 2004; HARPER et al., 2007a,b).

LPS é considerado como antígeno de proteção por estimular a resposta humoral como demonstrado pela produção de anticorpos monoclonais contra LPS de uma cepa sorotipo A, protegendo camundongos quando desafiados com cepas homólogas (WIJEWARDANA et al., 1990). Ainda, um estudo utilizando seis anticorpos monoclonais produzidos a partir de camundongos imunizados com *P. multocida* B (M1404) (serotipo 2 de Heddleston) reagiu com LPS homólogo, demonstrado por imunomarcção desses epítomos na superfície da célula. Esses anticorpos monoclonais opsonizaram *P. multocida* para a fagocitose por macrófagos em camundongos, no entanto, não foram bactericidas na presença do complemento. Assim, esses anticorpos promoveram apenas uma proteção parcial contra infecção de *P. multocida* em camundongos (RAMDANI & ADLER, 1991).

### 2.3.3. Outros fatores associados à virulência de *P. multocida*

Além da cápsula bacteriana e dos antígenos LPS, outros possíveis fatores associados à virulência de *P. multocida* tem-se estudado. No entanto, ainda não estão claros os determinantes associados à virulência em pneumonias e pleurisas em suínos. Na **tabela 3** estão descritos os principais genes conhecidos de *P. multocida* associados à virulência.

Um estudo de caracterização molecular realizado em 289 isolados de *P. multocida* de diferentes hospedeiros e doenças foi conduzido com o intuito de verificar a associação destes com o tipo capsular (capA, B, D, E e F) e com 14 genes associados a virulência (*ama87*, *psl*, *ompH*, *ptfA*, *pfhA*, *nanB*, *nanH*, *exbBD-tonB*, *tbpA*, *hgbA*, *hgbB*, *toxA*, *sodA* e *sodC*) (EWERS et al., 2006). Neste estudo foi demonstrado que o sorotipo A foi altamente adaptada em bovinos (92,3%) e aves (85,7%). Em suínos, o sorotipo D foi o mais prevalente (58,1%), sendo o A detectado em 34,9% dos animais. O sorotipo B foi exclusivo de isolados obtidos de hemorragias septicêmicas em búfalos e o F foi detectado em amostras de bovinos e gatos. O sorotipo E não foi encontrado.

Tabela 3: Genes associados à virulência de *Pasteurella multocida*.

<b>Gene</b>	<b>Fator de Virulência</b>	<b>Denominação em inglês</b>
<i>toxA</i>	Toxina dermonecrótica	Dermonecrotic toxin
<i>hgbA</i>	Proteína de ligação da hemoglobina	Hemoglobin-binding protein
<i>hgbB</i>	Proteína de ligação da hemoglobina	Hemoglobin-binding protein
<i>exbBD-tonB</i>	Aquisição de ferro	Iron acquisition
<i>fur</i>	Proteína de regulação da captação férrica	Ferric uptake regulation protein
<i>tbpA</i>	Proteína de ligação de transferrina	Transferrin binding protein
<i>nanH</i>	Neuraminidase	Neuraminidase
<i>nanB</i>	Neuraminidase	Neuraminidase
<i>psl</i>	Porina	Porin
<i>ompH</i>	Proteína H de membrana externa	Outer membrane protein H
<i>oma87</i>	Proteína 87 de membrana externa	Outer membrane protein 87
<i>ompA</i>	Proteína A de membrana externa	Outer membrane protein A
<i>plpB</i>	Lipoproteína B	Lipoprotein B
<i>pmHAS</i>	Síntese de ácido hialurônico	Hyaluronan synthase
<i>sodA</i>	Superóxido de dismutase	Superoxide dismutase
<i>sodC</i>	Superóxido de dismutase	Superoxide dismutase
<i>pfhA</i>	Hemaglutinina filamentosa	Filamentous hemagglutinin
<i>ptfA</i>	Fímbria tipo 4	Type 4 fimbriae
<i>fimA</i>	Fímbrias	Fimbriae
<i>hsf1</i>	Adesina de autotransporte	Autotransporter adhesion
<i>hsf2</i>	Adesina de autotransporte	Autotransporter adhesion
<i>tad (A-D)</i>	Proteínas de adesão	Putative nonspecific tight adherence protein

Pneumonias em suínos foram também associados tanto ao sorotipo A quanto ao D, ao contrário de outros estudos que associam essa doença com o sorotipo A (BOROWSKI et al., 2002; DAVIES et al., 2003; HERES, 2009; BETHE et al., 2009). Em relação aos genes associados à virulência, os *hgbB*, *tbpA* e *pfhA* foram associados com o status de doença em bovinos e apenas o *toxA* foi associado à doenças em suínos e ao sorotipo D. Mesmo que *toxA* seja determinante na patogenia de rinite atrófica (BUYS et al., 1990; LAX et al., 1990; REGISTER et al., 2012), Ewers et al. (2006) encontraram essa associação em apenas um dos três casos da doença do estudo. Em relação às pneumonias em suínos, é descrito que *toxA* não tem papel importante na rota de patogenia de pneumonias em suínos (DAVIES et al., 2003; BETHE et al., 2009; HERES 2009; BOYCE et al., 2010; REGISTER et al., 2012).

O mecanismo preciso pelo qual ocorre a aderência da *P. multocida* na célula do hospedeiro não é conhecido. Proteínas de membrana externa (OMPs) têm sido sugeridas como mecanismo de ligação da bactéria no muco e células epiteliais do pulmão e traqueia de bovinos, aves e suínos (JACQUES et al., 1993; LEE et al., 1994) e na nasofaringe, traqueia, pulmão e aorta de coelhos (AL-HADDAWI et al., 2000). Outro estudo demonstrou ainda a capacidade do *ompA* (proteína A de membrana externa) de se ligar com moléculas de heparina e fibronectina pertencentes à matrix extracelular, sugerindo um possível mecanismo da patogenia da bactéria (DABO et al., 2003). Além dessas OMPs, alguns gêneros bacterianos (*Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Yersinia*), assim como *Pasteurella*, apresentam o sistema de transporte macromolecular Tad (*tight adherence*) essenciais na formação de biofilme, colonização e patogenia de *P. multocida* (TOMICICH et al., 2007).

O conhecimento da função de *pfhaB* (hemaglutinina filamentosa) na patogenia de *P. multocida* é escasso. No entanto, a proteína codificada por esse gene demonstra uma semelhança significativa com a hemaglutinina filamentosa (Fha) detectada em isolados de *Bordetella pertussis*, que tem se mostrado importante na colonização inicial da faringe e da traqueia em um modelo experimental de infecção em camundongos (KIMURA et al., 1990). Estudos demonstram que cepas mutantes de *P. multocida* com inativação do gene *pfhaB2* se tornam fortemente atenuadas para a capacidade de colonizar o hospedeiro após o desafio intranasal em perus (TATUM et al., 2005). Outros estudos demonstraram mutantes *pfhaB* serem atenuadas em um modelo de septicemia em rato, sugerindo um papel crucial na fase inicial da colonização (FULLER et al., 2000). Entretanto, Bethe et al., (2009) não observaram associação desse gene entre suínos saudáveis e com pneumonia.



Além dos fatores associados à adesão e colonização da bactéria no hospedeiro, há também aqueles que estão relacionados ao metabolismo bacteriano, influenciando na sua capacidade em captar nutrientes do hospedeiro para a sua sobrevivência. O ferro é um essencial elemento que as bactérias necessitam adquirir para a sua sobrevivência no ambiente. Devido a sua toxicidade inerente, o nível de ferro livre "in vivo" é bastante limitado e *P. multocida*, assim como outras bactérias, tem desenvolvidos mecanismos para a aquisição e absorção de ferro. Isto pode ser demonstrado na análise da sequência genômica de *P. multocida* (PM70) isolada de aves, em que quase 2,5% do seu genoma codificam 53 proteínas altamente similares às proteínas envolvidas na aquisição ou absorção de ferro (MAY et al., 2001). Ainda, foi demonstrado que cepas do sorotipo A mutantes e com inativação dos genes *exbB*, *exbD*, *tonB*, *ouhgbA* se tornaram atenuadas em camundongos (FULLER et al., 2000; BOSCH et al., 2002a). Os ExbB, ExbD e TonB fazem parte do complexo de transporte TonB, necessário para o transporte e fornecimento de energia para o sequestro do ferro e o HgbA está previsto para ser uma proteína de ligação da hemoglobina necessário para a aquisição de ferro a partir de proteínas do hospedeiro (BOSCH et al., 2002b). Algumas proteínas de membrana externa (IROMPs) são reguladas de acordo com os níveis de ferro disponível no ambiente (CHOI-KIM et al., 1991; BORKOWSKA-OPACKA & AGNIESZKA KĘDRAK 2002). Foi demonstrado que soros na fase de convalescença, obtidos a partir de perus que sobreviveram à pasteurelose, continham anticorpos que reagiram as três IROMPs encontradas, indicando a expressão dessas proteínas *in vivo* (CHOI-KIM et al., 1991), sugerindo possíveis candidatos para vacinação com produção de resposta imune protetora cruzada entre os sorovares.

Outra via metabólica de *P. multocida* e de outras bactérias é a capacidade de remover ácido siálico por meio das sialidases das glicoproteínas e glicolipídios dos hospedeiros para o uso do carbono como fonte de energia (CORFIELD, 1992). Essas enzimas têm sido consideradas como fator de virulência bacteriano (CORFIELD, 1992; ROGGENTIN et al., 1993) e há um estudo que demonstra que cepas mutantes de *Streptococcus pneumoniae* com deficiência de sialidase tiveram pouca capacidade de colonizar e persistir na superfície da mucosa de chinchila, quando comparado com cepas selvagens (TONG et al., 2000). Foi demonstrado a presença de dois tipos de sialidase com especificações distintas (NanB e NanH) de isolados de *P. multocida* obtidos de casos de cólera aviária, com a hipótese de que a presença concomitante dessas enzimas podem aumentar a virulência bacteriana (MIZAN et al., 2000). A presença abundante dessas sialidases (NanB e NanH) em isolados de bovinos e

suínos já foi descrita, porém sem associação com *status* de doença (EWERS et al., 2006; GARCÍA et al., 2013).

Como demonstrado, pouco se sabe sobre a real importância dos genes associados à virulência com rota patogênica de *P. multocida* em causar doenças. Além do estudo de detecção desses genes nas cepas, é importante direcionar estudos que demonstram a estrutura molecular, bem como a sua funcionalidade. Assim, resultados mais concretos da associação com *status* de doença podem auxiliar nos estudos de patogenia das doenças.

#### 2.4. Genotipagem

A relação entre fatores de virulência de *P. multocida* e lesões pneumônicas é contraditória. Macroscopicamente, as lesões em que normalmente são isoladas amostras de *P. multocida* sorotipo A são difíceis de serem diferenciadas daquelas provocadas pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, que microscopicamente é definida como broncopneumonia exsudativa lobular (REGISTER, 2012). Tanto amostras de *P. multocida* do sorotipo A como do D são isoladas de pulmões com alterações patológicas (CAPPUCCIO et al., 2004, MORÉS, 2006). Em granjas livres de *A. pleuropneumoniae*, sorotipos somáticos da *P. multocida* sorotipo A:3 e D:3 e D:5 foram isoladas de lesões pulmonares acentuadas denominadas de “*A. pleuropneumoniae-like*”, ou seja, lesões de pleuropneumonia necro-hemorrágica, semelhantes às causadas pela infecção pelo *A. pleuropneumoniae* (CAPPUCCIO et al., 2004).

Estudos realizados por Harel et al. (1990) já indicavam que a técnica de restrição por endonuclease (*restriction endonuclease analysis-REA*) poderia ser utilizada como ferramenta para estudos epidemiológicos. Os autores analisaram o DNA genômico de amostras de *P. multocida* a fim de classificar isolados de 12 diferentes rebanhos suínos. Nos mesmos, as amostras com características similares de classificação pelo sorotipo capsular ou somático apresentaram o mesmo perfil de REA. Entre rebanhos, alguns isolados apresentaram perfil similar e muitos isolados do mesmo sorotipo apresentaram diferença na subtipagem por REA.

Gardner et al. (1994) realizaram outro estudo utilizando REA e ribotipagem em isolados de suínos com sinais clínicos de rinite atrófica (RA). Do total de quatro fenótipos (toxigênicas e não toxigênicas, tipos A e D) 17 perfis de REA e seis ribotipos foram identificados. Os resultados obtidos demonstraram que uma única fonte de infecção estava associada com a introdução na Austrália de reprodutores suínos de outros países. Ainda,

Nagai et al., (1994) deram início aos estudos utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*, PCR) ao desenvolver um método capaz de diferenciar *P. multocida* toxigênicas e não toxigênicas, tendo como alvo de amplificação do DNA, primers para o gene *toxA* (gene da toxina dermonecrótica). Os resultados obtidos na PCR foram comparados e apresentaram similaridade com os testes em animais e *western blot*.

A partir destes trabalhos iniciais, vários outros estudos foram realizados em outros países, com a finalidade de desenvolver PCR como método de diagnóstico mais rápido e sensível, bem como de caracterizar os isolados quanto ao tipo capsular e virulência dos mesmos, sem a necessidade do uso de animais ou cultivos celulares. Estes estudos tiveram como alvos diferentes sequências gênicas, bem como a possibilidade do uso da PCR multiplex (KAMP et al., 1996; LICHTENSTEIGER et al., 1996; TOWNSEND et al., 1998, 2000, 2001; EWERS et al., 2006; ATASHPAZ et al., 2009). Além do uso da PCR, outros estudos relatam também o uso de REA (DJORDJEVIC et al., 1998; BLACKALL et al., 2000; RÚBIES et al., 2002) e de eletroforese de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* - PFGE) como ferramentas discriminatórias em estudos epidemiológicos com isolados de *P. multocida* (LAINSON et al., 2002; LEOTTA et al., 2006; MAROIS et al., 2009)

No Brasil, historicamente, poucos estudos moleculares foram realizados. Borowski et al. (2002) realizaram estudo antigênico e fenotípico em 22 isolados de *P. multocida* oriundas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. Ainda, os mesmo isolados foram submetidos a PCR para o gene de proteína da membrana externa (*ompH*) seguido de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) com cinco enzimas a fim de analisar a variabilidade entre os isolados. Dos 22 isolados, 21 foram compatíveis com sorotipo capsular A. Também, foi possível agrupar os isolados em sete padrões distintos com boa correção com os testes bioquímicos. Moreno et al. (2003) analisaram 97 isolados de *P. multocida* subsp. *multocida*, oriundas de animais com pneumonia, rinite atrófica e septicemia, classificadas como sorotipos capsular A, D e F. A técnica utilizada foi *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SE-AFLP) que possibilita visualizar diferentes perfis (*fingerprinting*) de cada amostra. Neste estudo 18 perfis foram observados, sendo que amostras do mesmo rebanho apresentaram três perfis diferentes e a maioria dos isolados tipo capsular D provenientes da cavidade nasal e toxigênicos foram agrupados no mesmo cluster. Amostras da cavidade nasal também estavam presentes em outros clusters. Entre os isolados do tipo capsular A foi observado elevado índice de heterogeneidade genética. Ainda, foram observados isolados de diferentes estados de origem, mas com mesmo perfil genético.

Segundo os autores, o teste foi simples e forneceu grande potencial para a subtipagem de isolados de *P. multocida*.

Os poucos estudos realizados no Brasil, somados ao elevado índice de problemas respiratórios observados no campo e associados ao isolamento bacteriológico de *P. multocida* na maioria dos casos, indica fortemente a necessidade da ampliação de estudos moleculares em isolados deste agente.

## 2.5. Reprodução experimental de pneumonia por *P. multocida*

A grande dificuldade para a comprovação da atuação primária de *P. multocida* em pneumonias em suínos está em reproduzir a doença na ausência de cofatores de infecção, sejam eles infecciosos ou não infecciosos (ROSS, 2007). Poucos trabalhos tiveram sucesso na reprodução de pneumonias, pleurisias e septicemias através de desafio pela via intranasal e/ou intratraqueal com doses simples ou repetidas de *P. multocida* e (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003).

A indução de pneumonia primária e septicemia hemorrágica em suínos pelo sorotipo B de *P. multocida* está claramente descrita (RHOADES et al., 1967). Estes autores observaram lesões predominantes de pneumonia fibrinosa extensas e difusas associadas à polisserosite fibrinosa em suínos desafiados com *P. multocida* sorotipo B por aerossóis e pela via intranasal. O papel do sorotipo A em atuar como agente primário de pneumonia e pleurites em suínos é muito questionável. Historicamente, é descrito que *P. multocida* sorotipo A é incapaz de causar pneumonias em suínos na ausência de um cofator de infecção, seja ele infeccioso ou não-infeccioso, tais como o vírus influenza suína (SCOOT, 1938); vacinação contra a peste suína (PIJOAN & OCHOA, 1978); vírus da pseudorraiva (FUENTES & PIJOAN, 1987); vírus da PRRS associado a *Bordetella bronchiseptica* (BROCKMEIER et al., 2001); *M. hyopneumoniae* (SMITH et al., 1973b; CIPRIAN et al., 1988; AMASS et al., 1994), *Ascaris suum* associado ao *Arcanobacterium pyogenes* antes denominado de *Corynebacterium pyogenes* (OSE et al., 1973) ou à prednisolona (RAYNAUD et al., 1977); fumonisinas (HALLOY et al., 2005) e; amônia (NEUMANN et al., 1987a,b; )

Os primeiros trabalhos a demonstrar a atuação primária de *P. multocida* como causa de pneumonias em suínos foram realizados por Smith et al. (1973a,b), utilizando suínos gnotobióticos de 8 a 10 dias de vida como modelo experimental. No primeiro estudo (SMITH et al., 1973a) foi realizada a inoculação intranasal de *P. septica* (atualmente denominada *P.*

*multocida*) por três dias consecutivos em suíno gnotobiótico com 10 dias de idade. O animal morreu quatro dias após infecção. As lesões observadas foram exsudato amarelado e gelatinoso subcutâneo na região ventral do pescoço e tórax, com isolamento profuso de *P. multocida*. Os pulmões estavam severamente edematosos com presença de pneumonia fibrinosa crânio-ventral.

Em outro estudo realizado por Smith et al. (1973b), o desafio foi realizado por aerossóis por meio de nebulizadores durante três dias consecutivos. Neste experimento, estavam presentes lesões de consolidação pulmonar no lobo cranial direito com infiltração de macrófagos e neutrófilos e presença de células descamadas nos alvéolos com o cultivo de *P. multocida*. Além dessas lesões, foram também observadas alterações nos cornetos nasais, com perda ciliar focal, presença de células inflamatórias e formação de exsudação catarral macroscópica pronunciada. Ainda nesse estudo, ao desafiar os animais pela via intranasal e intratraqueal exclusivamente com *P. multocida*, houve desenvolvimento de septicemia, pneumonia e serosite fibrinosas na cavidade torácica, lesões articulares e tendinosas fibrinopurulentes, ou, ocasionalmente, rinite, broncopneumonia ou pneumonia intersticial. Quando associado com a infecção por *M. hyopneumoniae*, as lesões foram mais severas.

Um trabalho mais recente realizado por Ono et al. (2003), ao inocular pela via intratraqueal suínos de 8-14 semanas de vida oriundos de cesariana com privação de colostro ou de rebanho *specific pathogen free* (SPF), foram induzidas lesões de broncopneumonia exsudativa. Ao desafiar pela via intranasal, os autores observaram apenas lesões histológicas leves de broncopneumonia exsudativa. Um estudo preliminar, Kich et al. (2007) verificaram que um isolado de campo de *P. multocida* A (bacterioteca nº11246 da Embrapa Suínos e Aves, Concordia, Brasil) foi capaz de causar pleurite e pericardite fibrinosa acentuada e difusa e pneumonia necro-hemorrágica focal (conhecida como lesão *A. pleuropneumoniae-like*) em dois suínos desafiados com  $2,6 \times 10^7$  e  $2,1 \times 10^8$  UFC/ml de inóculo pela via intranasal.

Além dos estudos de desafio experimental em suínos, há outros registrando pneumonias em bovinos e búfalos. Após o desafio de bezerros de aproximadamente sete semanas de vida pela via intratraqueal com inóculo de *P. multocida* A:3 contendo  $10^9$  UFC/300ml, lesões severas de broncopneumonia fibrinossupurativa foram desenvolvidas ao 4º dia após infecção- dpi (DAGLEISH et al., 2010). As lesões progrediram para formação de abscessos no parênquima pulmonar com presença de trombose nos septos interlobulares ao 7ºdpi e abscessos maduros, compostos por necrose central com camadas circundantes de células polimorfonucleares, macrófagos e tecido fibrinoso ao 10ºdpi. Em búfalos jovens (12 – 15 semanas de idade), lesões semelhantes foram observadas após o desafio com isolado de *P.*

*multocida* A:1 ( $10^9$  UFC/50ml) também pela via intratraqueal (PRAVEENA et al., 2014). Nesses, as lesões foram de broncopneumonia fibrinossupurativa cranioventral (2ºdpi) com áreas necrose de coagulação (4ºdpi) semelhantes às causadas por *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* A em suínos (CAPPuccio et al., 2004; KICH et al., 2007; GOTTSCHALK, 2012) e *Mannheimia haemolytica* em bovinos (LÓPEZ, 2007).

## 2.6. Diagnóstico

O diagnóstico de pasteurelose pneumônica em suínos deve ser feito considerando o histórico do surto, verificação das alterações patológicas através da análise clínica, lesões macroscópicas na necropsia, exame histopatológico e identificação do agente após isolamento bacteriano (REGISTER et al., 2012). Problemas de pneumonia por *Pasteurella multocida* são observados principalmente em animais na fase de crescimento e terminação. Muitas vezes, a constatação do problema é feita apenas no frigorífico, no qual se observa o aumento da frequência de pneumonias, pleurites e pericardites com aderência dos órgãos na carcaça e, conseqüentemente, aumenta o número de desvio de carcaça para a área de inspeção final. Uma ferramenta muito utilizada por médicos veterinários sanitaristas de suínos para complementar o diagnóstico dos problemas clínicos no campo são as monitorias sanitárias no abate dos animais. Nessas, é possível quantificar o efeito das enfermidades observadas clinicamente no rebanho ou que se suspeita de estarem presentes na sua forma subclínica ou crônica (PIFFER e BRITO, 1991). Na granja, os principais sinais clínicos observados são alta hipertemia (temperatura retal  $\geq 40,0^\circ\text{C}$ ), dispneia (respiração abdominal) e prostração.

As lesões de pneumonia causadas por *P. multocida* não são patognomônicas e se assemelham com a broncopneumonia crânio-ventral presente na pneumonia causada por *M. hyopneumoniae*, pleurites e pericardites encontradas na doença de Glässer causada pela infecção por *H. parasuis* e lesões de pleuropneumonia necro-hemorrágica causadas por *A. pleuropneumoniae* (lesões do tipo *A. pleuropneumoniae* - like) (SMITH et al., 1973a,b; ONO et al., 2003; KICH et al., 2007; CAPPuccio et al., 2004; LÓPEZ, 2007; REGISTER et al., 2012). Diagnóstico diferencial de broncopneumonia purulenta ou pleuropneumonia pode incluir as lesões presentes nas infecções por *M. hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Treperella pyogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella* Sorovar *choleraesuis*, *Actinobacillus suis* e *A. pleuropneumoniae* (REGISTER et al., 2012). No contexto do complexo das doenças respiratórias dos suínos, muitas vezes o diagnóstico de pneumonia por *P. multocida* será associado a outro agente etiológico, principalmente *M.*

*hyopneumoniae* e influenza suína (MORÉS et al., 2011, 2013a,b) que apresentam alta prevalência nos rebanhos de suínos. Além disso, *P. multocida* e outras bactérias supracitadas, como *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis*, podem ser isoladas do trato respiratório superior e inferior de suínos saudáveis, atuando como microorganismos da microbiota residente. Assim, é imprescindível realizar a colheita e acondicionamento adequado de amostras na necropsia ou em pulmões de animais abatidos para o encaminhamento ao laboratório para identificação do agente.

As amostras de escolha para detecção do agente pelo cultivo bacteriológico são fragmentos de pulmão com lesões de pneumonia e suabes ou líquidos da cavidade torácica e do pericárdio na presença de exsudato serofibrinoso. Além da pesquisa etiológica pelo cultivo bacteriano, outras ferramentas podem ser usadas, tais como a PCR e a imunohistoquímica (IHQ). Mesmo com sensibilidade menor que a PCR, a IHQ é bastante útil por fornecer informações da presença do agente no local de lesão. Já a PCR indica apenas a presença ou ausência do material genômico do agente na amostra e não a viabilidade do agente. Além de detectar o agente etiológico, a PCR pode ter um papel importante na caracterização do agente envolvido, bem como a tipificação de fatores de virulência dos agentes, como realizada na detecção das RTX toxinas (ApxI, ApxII e ApxIII) de *A. pleuropneumoniae* (FREY et al., 1995). No entanto, atualmente não existe a definição clara de um marcador genético de virulência para *P. multocida* em caso de pneumonias em suínos. Outra ferramenta utilizada para detecção de *P. multocida* é a técnica molecular de hibridização in situ de fluorescência (FISH) que, além de apresentar alta especificidade e demonstrar a bactéria na lesão, o material genético é identificado em uma célula bacteriana com morfologia intacta (MBUTHIA et al., 2001; PORS et al., 2011).

### 3. Conclusões

Esta revisão de literatura teve como objetivo descrever a importância da associação de *P. multocida* com as pneumonias e pleurites dos suínos. Diversos estudos tem relatado que a bactéria é um agente oportunista em infecções causadas por outros microorganismos, tais como *M. hyopneumoniae* e vírus influenza. No entanto, outros estudos também relatam sua atuação primária nessas doenças. Talvez, a divergência na interpretação do papel do agente nas doenças respiratórias de suínos possa ser explicada pela diversidade genética da bactéria e, conseqüentemente, pela existência de diferentes perfis patogênicos circulando nos rebanhos de suínos. Mesmo que seja desconhecido o principal mecanismo de virulência da *P.*

*multocida*, já foram identificados alguns fatores associados à patogenicidade que podem explicar como a bactéria coloniza e promove a infecção do hospedeiro. Foi descrito que a cápsula bacteriana favorece no ambiente externo a sobrevivência bacteriana, evitando a dessecação, e no ambiente interno do hospedeiro, favorecendo a evasão da fagocitose e resistência ao complemento. Além disso, desempenha importante papel na aderência em células do hospedeiro, participando da colonização. Outras estruturas com papel importante na patogenia são os LPS, que induzem uma resposta inflamatória do hospedeiro e estimulam a resposta imune humoral. Ainda, alguns genes associados à virulência têm sido identificados como possíveis marcadores genéticos de patogenicidade, incluindo os relacionados à aquisição e utilização de substratos do hospedeiro para sobrevivência. No entanto, não se sabe a real importância desses genes na patogenia bacteriana, o que indica a necessidade de mais estudos para uma melhor definição do seu papel no processo da doença.

No Brasil, existe uma ocorrência significativa de pneumonias em suínos na fase de terminação, com características de mortalidade elevada e lesões septicêmicas, incluindo pneumonia necro-hemorrágica. Os problemas vêm se apresentando de forma crescente e existem dificuldades de controle, principalmente em função das restrições ao uso de terapia com antibióticos na proximidade do abate. Está claro o importante papel de *P. multocida* nessas pneumonias, pleurites e pericardites nos suínos e, atualmente, o seu controle é baseado em pulsos estratégicos com antimicrobianos. Episódios graves de pneumonias e desvio de carcaças no frigorífico devido a essas lesões vem ocorrendo com frequência. A ausência de um modelo experimental de reprodução da doença é um dos fatores limitantes ao desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo agente. Nesse sentido, os estudos realizados para desenvolver um modelo eficiente de reprodução da doença e detecção de um marcador genético de virulência para auxiliar no diagnóstico são fundamentais para facilitar o desenvolvimento de medidas profiláticas e de controle eficientes para prevenir e/ou controlar a infecção pelo agente.



## Referências Bibliográficas

- 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., 2007. 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 de palestras e resumos**. Florianópolis: Abraves, 2007. CD-ROM.
- AL-HADDAWI, M.; JASNI, H.; ZAMRI-SAAD, S.; MUTALIB, M.; ZULKIFLI, A.; SON, I.; SHEIKH-OMAR, A. In vitro study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung, and aorta of rabbits. **The Veterinary Journal**, v.159, p.274-281, 2000.
- AMASS, S.F.; CLARK, L.K.; VAN ALSTINE, W.G.; BOWERSOCK, T.L.; MURPHY, T.L.; KNOX, K.E.; ALBREGTS, S.R. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, p.102-107, 1994.
- ANDERSON, L.C.; RUSH, H.G.; GLORIOSO, J.C. Strain differences in the susceptibility and resistance of *Pasteurella multocida* to phagocytosis and killing by rabbit polymorphonuclear neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 1193–1198, 1984.
- ATASHPAZ, S.; SHAYEGH, J.; HEJAZI, M. S. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. **Research in Veterinary Science**. v.87, p.355-357, 2009.
- BETHE, A.; WIELER, L.H.; SELBITZ, H.; EWERS, C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 97-105, 2009.
- BLACKALL, P.J.; FEGAN, N.; PAHOFF, J.L.; STORIE, G.J.; MCINTOSH, G.B.; CAMERON, R.D.; O'BOYLE, D.; FROST, A.J.; BARA, M.R.; MARR, G.; HOLDER, J. The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 72,p. 111-120, 2000.
- BORKOWSKA-OPACKA, B.; KĘDRAK, A. Expression of Iron-Regulated Outer Membrane Proteins (IROMPs) by *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 46,p. 157-164, 2002.
- BOROWSKI, S.M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Estado do RS, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- BOROWSKI, S.M.; IKUTA, N.; LUNGE, V.; FONSECA, A.; MARQUES, E.; CARDOSO, M. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p.97-103, 2002.
- BOSCH, M.; GARRIDO, E.; LLAGOSTERA, M.; DE ROZAS, A. M. P.; BADIOLA, I.; BARBE, J. *Pasteurella multocida* exbB, exbD and tonB genes are physically linked but independently transcribed. **FEMS Microbiol Letters**, v. 210,p. 201–208, 2002a.
- BOSCH, M.; GARRIDO, M. E.; LLAGOSTERA, M.; DE ROZAS, A. M. P.; BADIOLA, I.; BARBE, J. Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. **Infection and Immunity**, v.70, p. 5955–5964, 2002b.

- BOYCE, J. D.; ADLER, B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3463–3468, 2000.
- BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 121–134, 2000.
- BOYCE, J. D.; ADLER, A. Acapsular *Pasteurella multocida* B:2 Can Stimulate Protective Immunity against Pasteurellosis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1943–1946, 2001.
- BOYCE, J. D.; HARPER, M.; WILKIE, I. W.; ADLER, B. *Pasteurella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Eds.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. State Avenue, Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2010. cap. 17, p. 325–346.
- BROCKMEIER S. L.; PALMER, M. V.; BOLIN, S. R.; RIMLER, R. Effects of intranasal inoculation with *Bordetellabronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 521–525, 2001.
- BUYS, W. E.; SMITH, H. E.; KAMPS, A. M.; KAMP, E. M.; SMITS, M. A. Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida* ssp. *multocida*. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 2815–2816, 1990.
- CAMERON, R.D.; O'BOYLE, D.; FROST, A.J.; GORDON, A.N.; FEGAN, N. An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in large pig herd. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, p. 27–29, 1996.
- CAPITINI, C.M.; HERRERO, I.A.; PATEL, R.; ISHITANI, M.B.; AND BOYCE, T.G. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 74–76, 1992.
- CAPPUCCIO, J.; LEOTTA, G.A.; VIGO, G.; MOREDO, F.; WOLCOTT, M.J.; PERFUMO, C.J. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs with broncho and pleuropneumonia. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 18., 2004, Hamburg/Germany. **Proceedings**. 2004, v.1, p.205.
- CARDOSO-TOSET, F.; GÓMEZ-LAGUNA, J.; CALLEJO, M.; VELA, A. I.; CARRASCO, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; MALDONADO, A.; LUQUE, I. Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 690–694, 2013.
- CARTER, G. R. Some characteristics of type A strains of *Pasteurella multocida*. **British Veterinary Journal**, v. 114, p. 356–357, 1958.
- CARTER, G.A. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. **Advances in Veterinary Science Comparative Medicine**, v. 11, p. 321–379, 1967.
- CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG., K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1977–1983, 1996.
- CHANTER, N.; MAGYAR, T.; RUTTER, J. M. Interactions between *Bordetellabronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 47, p. 48–53, 1989.
- CHOI-KIM, K.; MAHESWARAN, S. K.; FELICE, L. J.; MOLITOR, T. W. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiol**, v. 28, p. 75–92, 1991.

- CHRISTENSEN, G. Pleuropneumonia in swine due to *Haemophilus pleuropneumoniae* S. *parahaemolyticus*. II. Studies on the epidemiology and the relation to chronic pleuritis (pleural scars) in baconers (author's transl). **Nordisk veterinærmedicin**, v. 33, p. 236-49, 1981 (Article in Danish).
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Taxonomy and Biodiversity of Members of *Pasteurellaceae*. In: KUHNERT, P.; CHRISTENSEN, H. (Eds.). ***Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects***. Norfolk, UK, Caister Academic Press, 2008. cap 1, 1-26.
- CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Fowl Cholera. **Revue Scientifique et Technique**, v. 19, p. 626-637, 2000.
- CHUNG, J. Y.; WILKIE, I.; BOYCE, J. D.; TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; GHODDUSI, M.; ADLER, B. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2487-2493, 2001.
- CHUNG, J. Y.; ZHANG, Y. M.; ADLER, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, p. 289-296, 1998.
- CHUNG, W. B.; BÄCKSTRÖM, L.; MCDONALD, J.; COLLINS, M. T. *Actinobacillus pleuropneumoniae* culture supernatants interfere with killing of *Pasteurella multocida* by swine pulmonary alveolar macrophages. **Canadian Journal of Veterinary Research**; v. 57, p. 190-197, 1993.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; GAVA, D.; SCHAEFER, R.; KLEIN, C. S.; SILVA, V. S.; CARON, L. No indication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Brazilian swine herds. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 2013, St. Paul, Minnesota. **Proceedings**. Allen D. Lemman Swine Conference. St. Paul, Minnesota: University of Minnesota, 2013. p. 192.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; TROMBETTA, T.; VARGAS, I.; DA COSTA, D. E. M. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência rural**, v. 34, p. 449-455, 2004.
- CIPRIÁN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TÓRTORA, J.; COLMENARES, G.; LÓPEZ-REVILLA, R.; de la GARZAM, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 434-438, 1994.
- CLEVELAND-NIELSEN, A.; NIELSEN, E.O.; ERSBØLL, A.K. Chronic pleuritis in Danish slaughter pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, p. 121-135, 2002.
- CORFIELD, T. Bacterial sialidases—roles in pathogenicity and nutrition. **Glycobiology**, v. 2, p. 509-521, 1992.
- DABO, S. M.; CONFER, A. W.; QUIJANO-BLAS, R. A. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, p. 147-157, 2003.
- DAGLEISH, M. P.; FINLAYSON, J.; BAYNE, C.; MACDONALD, S.; SALES, J.; HODGSON, J. C. Characterization and Time Course of Pulmonary Lesions in Calves after Intratracheal Infection with *Pasteurella multocida* A:3. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, p. 157-169, 2010.
- DAVIES, R.L.; MACCORQUODALE, R.; BAILLIE, S.; CAFFREY, B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 59-67, 2003.

- DEVIES, R.L., Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16 rRNA gen. **Microbiology**, v. 150, p. 4199-4210, 2004.
- DE ALWIS, M. C. L.; WIJEWARDANA, T. G.; GOMIS, A. I. & VIPULASIRI, A. Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection) in buffaloes. **Tropical Animal Health Production**, v. 22, p. 185–194, 1990.
- DE ALWIS, M. C. Haemorrhagic septicaemia – a general review. **The British Veterinary Journal**, v. 148, p. 99-112, 1992.
- DeANGELIS, P. L.; PADGETT-McCUE, A. J. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 24124–24129, 2000.
- DeANGELIS, P. L.; JING, W.; DRAKE, R. R.; ACHYUTHAN, A. M. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 8454–8458, 1998.
- DeANGELIS, P. L. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. **Biochemistry**, v. 35, p. 9768–9771, 1996.
- DeANGELIS, P. L.; WHITE, C. L. Identification of a distinct, cryptic heparosan synthase from *Pasteurella multocida* types A, D, and F. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 8529–8532, 2004.
- DEBEY, M.; ROSS, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection Immunity**, v. 62, p. 5312-5318, 1994.
- DJORDJEVIC, S. P.; EAMENS, G. J.; HA, H.; WALKER, M. J.; CHIN, J. C. Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (tox A 7) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 679–688, 1998.
- EWERS C.; LÜBKE-BECKER, A.; BETHE, A.; KIEBLING, S.; FILTER, M.; WIELER, L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 304-317, 2006.
- FACHINGER, V.; BISCHOFF, R.; JEDIDIA, S.B.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. **Vaccine**, v. 26, p. 1488–1499, 2008.
- FALK, K.; HØIE, S.; LIUM, B.M. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 32, n. 1, p. 67-77, 1991.
- FAVRE-BONTE, S.; JOLY, B.; FORESTIER, C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 554–561, 1999.
- FERNANDEZ DE HENESTROSA, A.R.; BADIOLA, I.; SACO, M.; PEREZ, D. E.; ROZAS, A. M.; CAMPOY, S.; BARBE, J. Importance of the gale gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 311–316, 1997.
- FERREIRA, T. S. P.; FELIZARDO, M. R.; GOBBI, D. D. S.; GOMES, S. R.; FILSNER, P. H. L. N.; MORENO, M.; PAIXÃO, R.; PEREIRA, J. J.; MORENO, A. M. Virulence Genes

and Antimicrobial Resistance Profiles of *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Rabbits in Brazil. **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2012.

FREY, J.; BECK, M.; BOSCH, J. F. V.; SEGERS, R. P. A. M.; NICOLET, J. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Molecular and Cellular Probes**, v. 9, p. 277-282, 1995.

FULLER, T. E.; KENNEDY, M. J.; LOWERY, D. E. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 29, p. 25–38, 2000.

FUENTES, M.; PIJOAN, C. Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 1446–1448, 1987.

GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; GOYACHE, L.; DOMÍNGUEZ, L.; VELA, A. I. Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain. **Veterinary Record**, v. 169, p. 362-366, 2013.

GARDNER, I. A.; KASTEN, R.; EAMENS, G.; SNIPES, K. P.; ANDERSON, R. J. Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 442-447, 1994.

GOTTSCHALK, M. Actinobacillosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2012. p. 653-669.

HANSEN, L. M.; HIRSH, D. C. Serum resistance is correlated with encapsulation of avian strains of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 21, p. 177–184, 1989.

HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E.M.; NIELSEN, O.L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, p. 120-131, 2010.

HARDING, J. C.; HALBUR, P. G. PMWS or a group of PCV2-associated syndromes: ever-growing concerns. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 17, 2002, Ames, Iowa. **Proceedings**. PMWS and PCV2 Diseases, Beyond the Debate, Keynotes on the Merial Symposium and Brief Epidemiological Updates, Ames, 2002, p. 19-31.

HAREL, J.; CÔTÉ, S.; JACQUES, M. Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 422-426, 1990.

HARMON, B.G.; GLISSON, J.R.; LATIMER, K.S.; STEFFENS, W.L., NUNNALLY, J.C. Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1507–1511, 1991.

HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. The Key Surface Components of *Pasteurella multocida*: Capsule and Lipopolysaccharide. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 39–51, 2012.

HARMS, P.A.; HALBUR, P.G.; SORDEN, S. D. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. **Journal of Swine Health and Production**, v. 10, p. 27–30, 2002.

HARPER, M.; COX, A.; ST. MICHAEL, F.; PARNAS, H.; WILKIE, I.; BLACKALL, P. J.; ADLER, B.; BOYCE, J. D. Decoration of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide with phosphocholine is important for virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7384–7391, 2007b.

- HARPER, M.; BOYCE J. D.; WILKIE, I. W.; ADLER, B. Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5440–5446, 2003.
- HARPER, M.; BOYCE, J. D.; COX, A. D.; ST MICHAEL, F.; WILKIE, I. W.; BLACKALL, P. J.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* expresses two lipopolysaccharide glycoforms simultaneously, but only a single form is required for virulence: identification of two acceptor-specific heptosyl I transferases. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3885–3893, 2007a.
- HALLOY, D. J.; GUSTIN, P.G.; BOUHET. S.; OSWALD, I. P. Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurella multocida*. **Toxicology**, v. 213, p. 34–44, 2005b.
- HARPER, M.; COX, A. D.; St. MICHAEL, F.; WILKIE, I.; ADLER, B.; BOYCE, J.D. A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3436–3443, 2004.
- HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. Federation of European Microbiological Societies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, p. 1–10, 2006.
- HASSANIN, H. H.; TOTH, T. E.; ELDIMERDASH, M. M.; SIEGEL, P. B. Stimulation of avian respiratory phagocytes by *Pasteurella multocida*: effects of the route of exposure, bacterial dosage and strain, and the age of chickens. **Veterinary Microbiology** v. 46, p. 401-4013, 1995.
- HEDDLESTON, K. L.; REBERS, P. A. Fowl cholera. Cross immunity induced in turkeys with formalin-killed in vivo-propagated *Pasteurella multocida*. **Avian Diseases**, v. 16,p. 578–586, 1972.
- HERES, T. S. **Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- HØIE, S.; FALK, K.; LIUM, B. M. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 32, n. 3, p. 395-402, 1991.
- HURNIK, D.; DOHOO, I.R.; DONALD, A.; ROBINSON, N.P. Factor analysis of swine farm management practices on Prince Edward Island. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, p. 135-146, 1994.
- JACQUES, M.; KOBISCH, M.; BELANGER, M.; DUGAL, F. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4785-4792, 1993.
- JIRAWATTANAPONG, P.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; LEENGOED, L.V.; WISSELINK, H.; RAYMAKERS, R.; CRUIJSEN, T.; PEET-SCHWERING, C.V.D.; NIELEN, M.; NES., A.V. Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p.11-15, 2010.
- JORDAN, D.; HOFFMAN, L.; THACKER, E. *Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex (PRDC). **American Association Of Swine Veterinarians**,p. 149-152, 2006.
- JÜCH, M.; BÖTTCHER-LORENZ, J.,GROß, M. 76-jährige HundehalterinmitFieber und Dyspnoe. **Internist**, v. 53, p. 1114-1118. (Artigoemalémão), 2012.

- KAMP, E.M.; BOKKEN, G.C.; VERMEULEN, T.M.; DE JONG, M.F.; BUYS, H.E.; REEK, F.H.; SMITS, M.A. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swab specimens of pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 08,p. 304-309, 1996.
- KANE, T. A.; WHITE, C. L.; DeANGELIS, P. L. Functional characterization of PmHS1, a *Pasteurella multocida* heparosan synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281,p. 33192–33197, 2006.
- KICH, J. D.; MORES, N.; TRIQUES, N.; NOGUEIRA, M. G.; LOCATELLI, C.; KLEIN, C. S.; FELICIO, R. P. A. *Pasteurella multocida* tipo A atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos. **Comunicado Técnico n. 469**, Embrapa Suínos e Aves Concórdia, 7p, 2007.
- KIM, J.; CHUNG H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **Veterinary Journal**, v. 166, p. 251–256, 2003.
- KIMURA, A.; MOUNTZOUROS, K. T.; RELMAN, D. A.; FALKOW, S.; COWELL, J. L. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. **Infection Immunity**, v. 58, p. 7–16, 1990.
- KROLL, J. S.; HOPKINS, I.; MOXON, E. R. Capsule loss in *H. Influenza* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. **Cell**, v. 53,p. 347–356, 1988.
- LAINSON, F. A.; AITCHISON, K. D.; DONACHIE, W.; THOMSON, J. R. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p.588-593, 2002.
- LAX, A. J.; CHANTER, N.; PULLINGER, G. D.; HIGGINS, T.; STADDON, J. M.; ROZENGURT, E. Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. **FEBS Letters**, v. 277, p. 59–64, 1990.
- LEE, M. D.; WOOLEY, R. E.; GILISSON, J. R. Invasion of epithelial cells monolayers by turkeys strains of *Pasteurella multocida*. **Avian Disease**, v. 38,p. 72-77, 1994.
- LEOTTA, G. A.; CHINEN, I.; VIGO, G. B.; GUGLIADA, J.; RIVAS, M. Evaluación de dos técnicas de subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, p.190-196, 2006.
- LICHTENSTEIGER, C.; STEENBERGEN, S. M.; LEE, R. M.; POLSON, D. D.; VIMR, E. R. Direct PCR analysis of toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.12, p. 3035-3039, 1996.
- List of bacterial names with standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/index.html>. Acessado em: 09 de Janeiro de 2014.
- LÓPEZ, A. Respiratory System. In:McGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. (Eds.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. St. Louis: Mosby,2007. p. 463-558.
- LÓPEZ-CUENCA, S.; TEJERINA, E.; MARTÍN-POZO, M. A.; de la Cal, M.A. Shock séptico por *Pasteurella multocida* en un paciente previamente sano. **Medicina Intensiva Intensiva**, v. 37, p. 56-57, 2013.
- MACKIE, J.T.; BARTON, M.; KETTLEWELL, J. *Pasteurella multocida* septicemia in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 69,p. 227-228, 1992.
- MAHESWARAN, S. K.; THIES, E. Influence of encapsulation on phagocytosis of *Pasteurella multocida* by bovine neutrophils. **Infect. Immun**, v. 29, p. 76–81, 1979.

- MBUTHIA, P. G.; CHRISTENSEN, H.; BOYE, M.; PETERSEN, K. M.; BISGAARD, M.; NYAGA, P. N.; OLSEN, J. E. Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2627-2633, 2001.
- MORRISON, R. B.; PIJOAN, C.; HILLEY, H.D.; RAPP, V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 129-137, 1985.
- MATSUMOTO, M.; STRAIN, J. G.; ENGEL, H. N. The fate of *Pasteurella multocida* after intratracheal inoculation into turkeys. **Poultry Science**, v. 70, p. 2259-2266, 1991.
- MAROIS, C.; FABLET, C.; GAILLOT, O.; MORVAN, H.; MADEC, F.; KOBISCH, M. Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1830-1836, 2009.
- MAY, B. J.; ZHANG, Q.; L. I.; L. L.; PAUSTIAN, M. L.; WHITTAM, T. S.; KAPUR, V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 3460-3465, 2001.
- MIYOSHI, S.; HAMADA, H.; MIYOSHI, A.; ITO, R.; HAMAGUCHI, N.; MURAKAMI, S.; MIYAMOTO, H.; TAKEUCHI, T.; OKURA, T.; HIGAKI, J. *Pasteurella multocida* pneumonia: Zoonotic transmission confirmed by molecular epidemiological analysis. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 12, p. 159-163, 2011.
- MORENO, A. M.; BACCARO, M. R.; FERREIRA, A. J. P.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Use of Single-Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p. 1743-1746, 2003.
- MORÉS, M. A. Z. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MORES, M. A. Z.; KUCHIISHI, S. S.; ASCOLI, K. R.; MORES, N. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 15., 2011, Fortaleza. **Anais de palestras e resumos**. Fortaleza: Abraves, 2011. CD-ROM.
- MORÉS, M.A.Z. OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; BELLAVAR, F.A.V.; IANISKI.; KLEINC. S.; BARCELLOS, D.E.N.; MORÉS, N., 2013a. Anatomopatologia e agentes infecciosos em lesões pulmonares de suínos ao abate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 16., 2013, Cuiabá. **Anais de palestras e resumos**. Cuiabá: Abraves, 2013. CD-ROM.
- MORÉS, M.A.Z.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; BELLAVAR, F.A.V.; IANISKI.; KLEINC. S.; BARCELLOS, D.E.N.; MORÉS, N.; 2013b. Complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) no Brasil: anatomopatologia e microbiologia de casos clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 16., 2013, Cuiabá. **Anais de palestras e resumos**. Cuiabá: Abraves, 2013. CD-ROM.
- MOUSING, J.; LYBYE, H.; BARFOD, K.; MEYLING, A.; RONSHOLT, L.; WIUEBERG, P. Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, p. 107-119, 1990.



- MIZAN, S.; HENK, A.; STALLINGS, A.; MAIER, M.; LEE, M. D. Cloning and characterization of sialidases with 2-6 and 2-3 sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. **Journal Bacteriology**, v. 182, p. 6874–6883, 2000.
- MOXON, E. R.; DEICH, R. A.; CONNELLY, C. Cloning of chromosomal DNA from *Haemophilus influenzae*. Its use for studying the expression of type b capsule and virulence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 298–306, 1984.
- MUHAIWA, A. P.; CHRISTENSEN, J. P. & BISGAARD, M. Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. **Avian Pathology**, v. 29, p. 133–142, 2000.
- MUTTERS, R.; IHM, P.; POHL, S.; FREDERIKSEN, W.; AND MANNHEIM, W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 309–322, 1985.
- NAGAI, S.; SOMENO, S.; YAGIHASHI. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1004–1010, 1994.
- NEUMANN, R.; MEHLHORN, G.; BUCHHOLZ, I.; JOHANNSEN, U.; SCHIMMEL, D. Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung einer chronischen aerogenen Schadgasbelastung des Saugferkels mit Ammoniak unterschiedlicher Konzentrationen. II. Die Reaktion zellulärer und humoraler Infektionssabwehrmechanismen NH<sub>3</sub>-exponierter Saugferkel unter den Bedingungen einer experimentellen *Pasteurella-multocida*-Infektion mit und ohne thermomotorische Belastung. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 14, p. 241–253, 1987b.
- NEUMANN, R.; MEHLHORN, G.; LEONHARDT, W.; KASTNER, P.; WILLIG, R.; SCHIMMEL, D.; JOHANNSEN, U. Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung einer chronischen aerogenen Schadgasbelastung des Saugferkels mit Ammoniak unterschiedlicher Konzentrationen. I. Das klinische Bild NH<sub>3</sub>-exponierter Saugferkel unter den Bedingungen einer experimentellen *Pasteurella-multocida*-Infektion mit und ohne thermomotorische Belastung. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 34, p. 183–196, 1987a.
- NOEL, G.J.; HOISETH, S.K.; EDELSON, P.J. Type b capsule inhibits ingestion of *Haemophilus influenzae* by murine macrophages: studies with isogenic encapsulated and unencapsulated strains. **Journal of Infection Diseases**, v. 166, p. 178–182, 1992.
- ONO, M.; OKADA, M.; NAMIMATSU, T.; FUJII, S.; MUKAI, T.; SAKANO, T. Septicaemia and arthritis in pigs experimentally infected with *Pasteurella multocida* capsular serotype A. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 251–258, 2003.
- OSE, E.; MUENSTER, O. A.; RATHMACHER, R. P. Effect of tylosin and sulfamethazine on experimentally-induced bacterial swine pneumonia. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 68, p. 539–543, 1973.
- OPHIR, T.; GUTNICK, D. L. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 740–745, 1994.
- OPRIESSNIG, T.; GIMENEZ-LIROLA, L.G.; HALBUR, P.G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, p. 133–148, 2011.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and

- intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 591-615, 2007.
- PALADINO, E. S. **Aspectos anatomopatológicos de pneumonias em suínos de terminação causadas pela *Pasteurella multocida* de alta patogenicidade**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- PANDIT, K. K.; SMITH, J. E. Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. **Research in Veterinary Science**, v. 54, p. 20–24, 1993.
- PASTEUR, L. De l'atténuation du virus du choléra des poules. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 91, p. 673–680, 1880.
- PASTEUR, L. Sur les virus-vaccins du choléra des poules et du charbon. **C R Trav Congr Int Dir Agronom session de Versailles**, p. 151–162, 1881.
- PIETRO, C.; CASTRO, J. M. Porcine reproductive and respiratory syndrome vírus infection in boar: a review. **Theriogenology**, v.63, n. 1, p. 1-16, 2005.
- PIFFER, I. A.; BRITO, J. R. F. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos. **Comunicado Técnico n. 23**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, 12p, 1991.
- PIFFER, I. A.; BRITO, J. R. F., 1993. Pneumonia em suínos. **Suinocultura Dinâmica**, n. 8, 1-6. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/sudi008.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/sudi008.pdf)
- PIJOAN, C.; OCHOA, G. Interaction between a hog cholera vaccine strain and *Pasteurella multocida* in the production of porcine pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v.88, p. 167–170, 1978.
- PIJOAN, C.; FUENTES, M. Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, p. 823-826, 1987.
- PORS, S. E.; HANSEN, M. S.; BISGAARD, M.; JENSEN, H. E. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Veterinary Microbiology**, v. 150, p. 160-166, 2011.
- PRAVEENA, P. E.; PERIASAMY, S.; KUMAR, A. A.; SINGH, N. Pathology of Experimental Infection by *Pasteurella multocida* Serotype A:1 in Buffalo Calves. **Veterinary Pathology**, 2014. (Emprelo).
- PRUIMBOOM, I.M.; RIMLER, R.B.; ACKERMANN, M.R. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. **Infect. Immun**, v. 67, p. 1292–1296, 1999.
- PRUIMBOOM, I.M.; RIMLER, R.B.; ACKERMANN, M.R.; BROGDEN, K.A. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. **Avian Disease**, v. 40, p. 887–893, 1996.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGEN, P. J. *Pasteurella* species, *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi*. In: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2. ed. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell, 2011. cap. 27, p. 300–308.
- RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635–700, 2002.
- RAMDANI, ADLER, B. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS in immunity. **Veterinary Microbiology**, v. 26, p. 335–347, 1991.

- REGISTER, K. B.; BROCKMEIER, S. L.; de JONG, M. F.; PIJOAN, C. Pasteurellosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L. A.; RAMIRES, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p. 798-810.
- RHOADES, K. R.; HEDDLESTON, K. L.; REBERS, P.A. Experimental hemorrhagic septicemia: gross and microscopic lesions resulting from acute infections and from endotoxin administration. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 31, p. 226–233, 1967.
- RHOADES, K. R.; RIMLER, R. B. *Pasteurella multocida* colonization and invasion in experimentally exposed turkey poults. **Avian Disease**, v. 34, p. 381-383, 1990.
- RIMLER R. B.; RHOADES K. R. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 615–618, 1987.
- RIMLER, R. B. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. **Veterinary Record**, v. 134, p. 191–192, 1994.
- ROGGENTIN, P.; SCHAUER, R.; HOYER, L. L.; VIMR, E. R. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 915–921, 1993.
- ROSS, R.F. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, p. 13-29, 2007.
- RÚBIES, X.; CASAL, J.; PIJOAN, C. Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid. **Veterinary Microbiology**, v.84, p.69-78, 2002.
- RAYNAUD, J.P.; BRUNAUT, G.; MAIRE, C.; RENAULT, L. AND PERREAU P. Pourvoir pathogène de *Pasteurella multocida* pour le jeune porc. Essai de réalisation d'un modèle de pneumonie aiguë expérimentale. **Journées de la Recherche Porcine en France**, p. 165–169, 1977.
- SCHNITZLER, S. U.; SCHNITZLER, P. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. **Virus Genes**, v. 39, p. 279-292, 2009.
- SCOTT, J. P. Swine influenza. **Proceedings of the XIII<sup>th</sup> International Veterinary Congress 1**, 479–490, 1938.
- SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y.; SEKIZAKI, T.; MORI, Y.; KUBO, M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. **Infect. Immun**, v. 62, p. 2806–2810, 1994.
- SMITH, H. E.; DAMMAN, M.; VAN DER VELDE, J.; WAGENAAR, F.; WISSELINK, H. J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; SMITS, M. A. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1750–1756, 1999.
- SMITH, H.E.; DAMMAN, M.; VAN DER VELDE, J.; WAGENAAR, F.; WISSELINK, H. J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; SMITS, M. A. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. **Infect. Immun**, v. 67, p. 1750–1756, 1999.
- SMITH, I. M.; BETTS, A. O.; WATT, R. G.; HAYWARD, A. H. S. Experimental infections with *Pasteurella septica* (serogroup A) and an adeno or enterovirus in gnotobiotic piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v. 83, p. 1–1, 1973a.
- SMITH, I.M.; HODGES, R. T.; BETTS, A. O.; HAYWARD, A. H. S. Experimental infections with *Pasteurella septica* (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 83, p. 307-321, 1973b.

- SNIPES, K. P.; HIRSH, D. C. Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. **Avian Disease**, v. 30, p. 500–504, 1986.
- SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I.A.; FREITAS, A.R. Impacto de doenças respiratórias dos suínos nos sistemas de produção do estado de Santa Catarina. **Comunicado Técnico n. 123**. Embrapa Suínos e Aves Concórdia, 1987, 4p.
- SONCINI, R.A.; MORÉS, N. Monitoramento de suínos para detectar doenças subclínicas no rebanho. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Águas de Lindóia, SP, 1991. **Anais...Águas de Lindóia: ABRAVES**, p. 95, 1991.
- SØRENSEN, V.; JORSAL, S.E.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLARIE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Blackwell Publishing, Oxford, 2006. p. 149-177.
- STÄRK, K. D. C. Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental 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. 71p. Dissertação (Mestrado em Produção e Sanidade de Suínos) -, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.
- TALAN, D. A.; CITRON, D. M.; ABRAHAMIAN, F. M.; MORAN, G. J.; GOLDSTEIN, E. J. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. Emergency Medicine Animal Bite Infection Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v.340, p. 85-92, 1999.
- TANG, X.; ZHAO, Z.; HU, J.; WU, B.; CAI, X.; HE, Q.; CHEN, H. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 951–958, 2009.
- TATUM, F. M.; YERSIN, A. G.; BRIGGS, R. E. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* fhaB2 mutant in turkeys. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, p. 9–17, 2005.
- THACKER, E. L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 17, p. 551-565, 2001.
- THACKER, E.L. Mycoplasmal disease. In: STRAW, B.E., ZIMMERMANN, J.J., D'ALLAIRE, S. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. 9.ed. Ames: Iowa State University, 2006. p. 701-717.
- THAKKER, M.; PARK, J. S.; CAREY, V.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5183–5189, 1998.
- THOMSON, J.R.; MACINTYRE, N.; HENDERSON, E.A.; MEIKLE, C.S. Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, v. 149, p. 412-417, 2001.
- TOMICH, M.; PLANET, P. J.; FIGURSKI, D. H. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. **Nature Publishing Group**, v. 5, p. 363-375, 2007.
- TONG, H. H.; BLUE, L. E.; JAMES, M. A.; DEMARIA, T. F. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 921–924, 2000.

- TOWNSEND, K. M.; BOYCE, J.D.; CHUNG, J.Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* caploci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 924–929, 2001.
- TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J.; LEE, C.W.; PAPADIMITRIOU, J.M., Dawkins, H.J.S. Development of PCR Assays for Species- and Type-Specific Identification of *Pasteurella multocida* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1096–1100, 1998.
- TOWNSEND, K.M.; HANH, T. X.; O’BOYLE, D.; WILKIE, I, PHAN, T.T.; Wijewardana, T.G., Trung, N.T., Frost, A.J. PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p.69–78, 2000.
- 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.
- VARGA, Z.; VOLOKHOV, D. V.; STIPKOVITS, L.; THUMA, A.; SELLYEI, B.; MAGYARA, T. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese. **Veterinary Microbiology**, v. 163, p. 149–156, 2013.
- WALLWITZ DE ARAÚJO, A.O. Abscessos pulmonares em suínos abatidos industrialmente: bacteriologia, anatomopatologia e relação entre portas de entrada e lesões macroscópicas. Porto Alegre, 2004. 86p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
- WEBER, D. J.; WOLFSON, J. S.; SWARTZ, M. N.; HOOPER, D. C. *Pasteurella multocida* infections: Report of 34 cases and review of the literature. **Medicine**, v. 63, p. 132–54, 1984.
- WESSELS, M. R.; GOLDBERG, J. B.; MOSES, A. E.; DICESARE, T. J. Effects on virulence of mutations in a locus essential for hyaluronic acid capsule expression in group A streptococci. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 433–441, 1994.
- WIJewardana, T. G.; WILSON, C. F.; GILMOUR, N. J.; POXTON, I. R. Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective anti-lipopolysaccharide antibody. **Journal of Medical Microbiology**, v.33, p. 217–222, 1990.
- WILKIE, I. W.; GRIMES, S. E.; O’BOYLE, D. & FROST, A. J. The virulence and protective efficacy for chickens of *Pasteurella multocida* administered by different routes. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 57–68, 2000.
- WILKEI, I. W.; HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida*: Disease and Pathogenesis. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 361, p. 1–22, 2012.
- ZUPPARDO, A. B.; SIEBELING, R. J. An epimerase gene essential for capsule synthesis in *Vibrio vulnificus*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2601–2606, 1998.

### 3. CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

#### *Pasteurella multocida* A as the primary agent of pneumonia and septicemia in pigs

##### **Abstract**

In order to gain a better understanding of the pathological aspects and spread of *Pasteurella multocida* A as the primary cause of pneumonia in pigs an experiment involving the intranasal inoculation of different concentrations of inocula [Group (G1):  $10^8$  Colony Forming Units (CFU)/ml; G2:  $10^7$  CFU/ml; G3:  $10^6$  CFU/ml and G4:  $10^5$  CFU/ml], using two pigs per group was conducted. These pigs were obtained from a high health status herd. Pigs were monitored clinically for four days and subsequently necropsied. All pigs had clinical signs and lesions associated with respiratory disease. Dyspnoea and hyperthermia were the main clinical signs observed. Suppurative cranioventral bronchopneumonia, in some cases associated with necrosuppurative pleuropneumonia, fibrinous pericarditis and pleuritis were the most frequent types of lesion found. The disease evolved with septicaemia, characterized by septic infarctions in the liver and spleen, with the detection of *P. multocida* A. In this study, *P. multocida* A strain #11246 was the primary agent of fibrinous pleuritis and suppurative cranioventral bronchopneumonia, pericarditis and septicaemia in pigs. All concentrations of inoculum used ( $10^5$ - $10^8$  CFU/ml) were able to produce clinical and pathological changes of pneumonia, pleuritis, pericarditis and septicemia in challenged animals.

**Keywords:** Swine pasteurellosis; Necrosuppurative pleuropneumonia; Sepsis.

## 1. Introduction

Respiratory diseases are responsible for significant economic losses in pig production (Sørensen et al., 2006). *Pasteurella multocida* is one of the bacterial agents most commonly isolated from pneumonic lesions in pigs (Falk et al., 1991; Høie et al, 1991; Choi et al., 2003). This bacterial species belongs to the family *Pasteurellaceae*, which includes other species associated with pneumonia and polyserositis in pigs, such as *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*, respectively (Vanalstine, 2012). Typically, *P. multocida* is regarded as a secondary opportunistic agent of enzootic pneumonia caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pijoan and Fuentes, 1987; Hansen et al., 2010). In addition to secondary role in bronchopneumonia, *P. multocida* may cause pleuritis, pericarditis (Pijoan and Fuentes, 1987; Ono et al., 2003; Pors et al., 2011a) and necrohemorrhagic pneumonia, similar to that caused by *A. pleuropneumoniae* ("*A. pleuropneumoniae*-like") (Cappuccio et al., 2004).

The successful experimental reproduction of porcine pneumonia by *P. multocida* has been achieved only when associated with other agents (Ross, 2007). A preliminary study (Kich et al., 2007) verified that a field isolate of *P. multocida* A (bacterium collection #11246, Embrapa Swine and Poultry, Concordia, Brazil) was able to cause marked fibrinous pleuritis and pericarditis and focal necrohemorrhagic pneumonia (*A. pleuropneumoniae*-like lesions) after intranasal inoculation. Doses of  $2.6 \times 10^7$  and  $2.1 \times 10^8$  colony forming units (CFU)/ml were used in this study (each pig received 1.5 ml/nostril of the inoculum). As a result, the aim of present study was to establish an experimental model for reproducing pneumonia and systemic lesion characterized by serositis and septicemia by solely inoculation *P. multocida* A strain 11246 in pigs.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethics statement

The experiment was conducted at Embrapa Swine and Poultry Research Centre, Concordia-SC, Brazil in compliance with the Ethics Principles in Animal Experimentation, being approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA/CNPSA) (Protocol #005/2010).

## 2.2. *Animal houses*

Eight 50 kg b.w. 100 day-old pigs from a high health status herd raised at the Embrapa Swine and Poultry Research Centre, Concordia-SC, Brazil, facilities were used in this study. The source herd has been negative for the main respiratory pathogens based on semianually tests of bacterial isolation of tonsillar swabs (*P. multocida* A and D, *Bordetella bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis* and *Streptococcus suis*), Nested-PCR and PCR (*M. hyopneumoniae* and *A. pleuropneumoniae*, respectively) and Elisa test (*M. hyopneumoniae* and PRRS). Circulating antibodies against influenza A virus were detected on basal levels by ELISA, however, no viral genetic material was detected by RT-PCR test. Furthermore, respiratory diseases, such as enzootic pneumonia, influenza, polyserositis or Glässer's disease, atrophic rhinitis, pleuropneumonia and pasteurellosis have never been diagnosed since the farm was populated with caesarean derived animals in 2009. The farm respects strict biosecurity guidelines and has health barriers, closed rooms with positive internal pressure, visit restrictions and regular monitoring.

The animals were transferred from the farm to the isolation unit facilities (biosafety level 2) at the premises of the Animal Health and Genetics Laboratories at Embrapa Swine and Poultry, Concordia-SC, Brazil. Each group was housed in a different room, two pigs per pen, receiving food and water "*ad libitum*". Access to animals was restricted to the staff responsible for the experiment.

Before inoculation, two swabs were obtained from each pig, one from the palatine tonsils and one from the nasal cavity. A pool of these two swabs was cultured using routine methods for the isolation of bacterial pathogens of the respiratory tract of pigs (*A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* and *P. multocida*) (Quinn et al., 1994). *M. hyopneumoniae* testing was undertaken through Nested PCR assay from individual tonsillar swabs, according to Yamaguti et al. (2008).

## 2.3. *Bacteria culture and inoculum*

The *P. multocida* serotype A, strain #11246 from Embrapa Swine and Poultry Research Centre collection was used. This bacterial strain was isolated from pleura and lung swabs of a finishing pig from a farrow-to-finish farm with 200 sows in the state of Santa Catarina, Brazil, in 2007. The pig had severe respiratory disease and fibrinosuppurative pleuropneumonia.



Some animals from the same batch were necropsied and mucopurulent pneumonia affecting large areas of the lung (approximately 60%), diffuse pleurisy and adherence between the parietal and visceral pleura were present. The isolate was characterized based on phenotypic (Quinn et al., 1994) and molecular features (Townsend et al., 2001). Virulence-associated genes encoding haemoglobin binding protein *hgbB*, filamentous haemagglutinin *pfhA*, dermonecrotxin *toxA* and transferrin-binding protein *tbpA* were tested by PCR, according to Ewers et al. (2006) and Atashpaz et al. (2009).

The recovery of *P. multocida* A from the stock was performed by culture on blood agar plates (Blood Agar Base, BD Difco™, 5% sheep's blood) incubated at 37°C for 18-24 hours. A subculture on a Trypticase Soy Agar (TSA) plate (Difco™) was incubated at 37°C for 18-24 hours. The identity of this isolate was confirmed by phenotypic standard (Quinn et al., 1994).

Four different concentrations of inocula were prepared. The seed consisted of a suspension of bacterial colonies of the third passage from the TSA medium in 0.9% sterile saline adjusted to 0.7 absorbance (measured in a spectrophotometer at 540nm). From this seed, a series of base 10 dilutions were prepared (1:10, 1:100 and 1:1000). Inoculum concentrations were confirmed by counting the CFU.

#### 2.4. Study design

Four groups (G1, G2, G3 and G4) of two pigs each were challenged with different concentrations of *P. multocida* A strain 11246 inoculum as follows: G1: 10<sup>8</sup> CFU/ml (pigs 131 and 135); G2: 10<sup>7</sup> CFU/ml (pigs 129 and 130); G3: 10<sup>6</sup> CFU/ml (pigs 140 and 142) and G4: 10<sup>5</sup> CFU/ml (pigs 139 and 143). Each pig received 3.0 ml (1.5 ml/nostril) of the inoculum, administered by slow intranasal drip with animals in a sitting position. Another two pigs (177 and 199) housed separately were used as negative controls and inoculated with 3 ml sterile phosphate buffered saline - PBS (1.5 ml/nostril).

All pigs were clinically evaluated twice a day (8-9 am and 4-5 pm), starting just prior to inoculation (day 0 am) and ending on the 4<sup>th</sup> day post-inoculation (dpi). Rectal body temperature (with a digital thermometer), dyspnoea (evaluated with pigs lying down) and coughing (5 min. with pigs moving during feeding and cleaning of pens) were evaluated.

### 2.5. *Necropsy and sampling*

Pigs were euthanized by electrocution, bled and necropsied on the 4<sup>th</sup> dpi. Pigs with clinical signs of severe pneumonia were euthanized immediately due to animal welfare. At necropsy, the type, distribution and severity of lung, pleural and pericardic lesions were recorded. Samples of lung, trachea, mediastinal lymph node, heart, pericardial sac, liver, kidney and spleen were collected for histopathology and bacteriology. One portion of each sample was preserved in 10% buffered formaldehyde for histopathology and immunohistochemistry (IHC) for *P. multocida* A. The other fragment was placed in a sterile plastic bag and stored at 2-8 °C for bacteriological examination. Whenever present, fibrinous exudates in the pleura, pericardium, peritoneum and joints were also collected aseptically for bacteriological examination.

### 2.6. *Histopathology and Immunohistochemistry (IHC)*

Histopathological slides were prepared by routine procedures and stained with hematoxylin and eosin. For IHC, a sheep hyperimmune serum against *P. multocida* was prepared. Briefly, the antigen was produced by growing *P. multocida* A in TSB, inactivating the bacteria with 0.12% formaldehyde, centrifuging the culture at 12,000g and washing the pellet obtained in phosphate buffered saline (PBS). The pellet was resuspended in PBS with thimerosal (0.2 g/L) and stored at 4-8 °C. This inoculum was used in seven serial inoculations carried out in two sheep (one year of age) by intramuscular route, with the antigen adjusted in a spectrophotometer to a transmittance of 37% (540 nm). The first four doses were administered only with inactivated antigen at two-day intervals. For the last three doses the inactivated antigen was mixed with aluminium hydroxide (AlOH) and administered every seven days.

After processing and microtomy, tissue fragments with 3-5 µm thickness were fixed on poly-L-lysine treated slides, dewaxed, hydrated, and then subjected to the following steps: antigen retrieval in tissues by microwave irradiation for 5 min at 700W followed by enzymatic digestion with 0.04% pepsin (pH 7.8) for 10 min at 37°C; blocking of endogenous peroxidase with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; incubation of sections for 2 h at 37°C covered with the anti-*P. multocida* primary sheep polyclonal antibody in a dilution of 1:500; incubation of sections for 30 min at 37°C with the LSAB<sup>®</sup> HRP Kit (DakoCytomation®); use of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) for 5 min at 37°C; and counterstaining with Mayer's haematoxylin for 1

min. PBS (pH 7.4) was employed for washings between each step. All tissues obtained in the experiment were subjected to this technique. A fragment of lung with lesions (in stock) from a previously inoculated pig with the same *P. multocida* A isolate was used as a positive control and as a negative control different samples of normal specific pathogen-free (SPF) pig to *P. multocida* were used.

The specificity of the IHC technique was tested using swine tissues samples with typical lesions, experimentally infected with *A. pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *H. parasuis* and *M. hyopneumoniae*. The Chi-square test ( $X^2$ ) was performed to demonstrate the association between the IHC and bacteriology results for the lung, pericardium, trachea, mediastinal lymph nodes, spleen and kidneys samples. Furthermore, the agreement, sensitivity and specificity of the IHC test were calculated adopting the bacteriology results as gold standard method.

## 2.7. Microbiology

All tissues, swab samples and exudates collected were plated on blood agar and MacConkey (Difco™) plates and incubated at 37°C for 24-48 hours under aerobic conditions. A streak of *Staphylococcus aureus* was added to a replicate plate and incubated microaerophilically at 37°C for 24-48 hours. The biochemical characterization of isolates was carried out according to Quinn et al. (1994).

## 2.8. Other pathogens

In order to verify the presence of other primary respiratory pathogens, the IHC test was carried out for Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) (Ciacci-Zanella et al., 2006), influenza A virus (Vincent et al., 1997) and *M. hyopneumoniae* in all lung samples. For PCV2 the test was also performed in mediastinal lymph nodes. In order to detect *M. hyopneumoniae*, a monospecific recombinant polyclonal antibody against lactate dehydrogenase (p36) of *M. hyopneumoniae* (Castro et al., 2009) with a 1:1800 dilution was used. The IHC procedure for *M. hyopneumoniae* was standardized by our group, applying the streptavidin-biotin-peroxidase method with the commercial kit (Kit LSAB ® + System – HRP from DakoCytomation ®). The antigen retrieval was performed by immersing the slides in citrate buffer (pH 6.0) and irradiating them in a domestic microwave for 5 min at 700W. The enzymatic digestion was then performed using pepsin at 0.04% diluted in 0.01 N hydrochloric

acid (pH 7.8) for 10 min at 37°C. Tissue sections were labelled with primary antibody (anti-P36) for 2 h at 37°C. The final colour was attained with AEC solution for 5 min at 37°C, and counterstaining with Mayer's haematoxylin for 2 min.

## 2.9. Statistics

Descriptive analysis was performed and the overall result shown in tables.

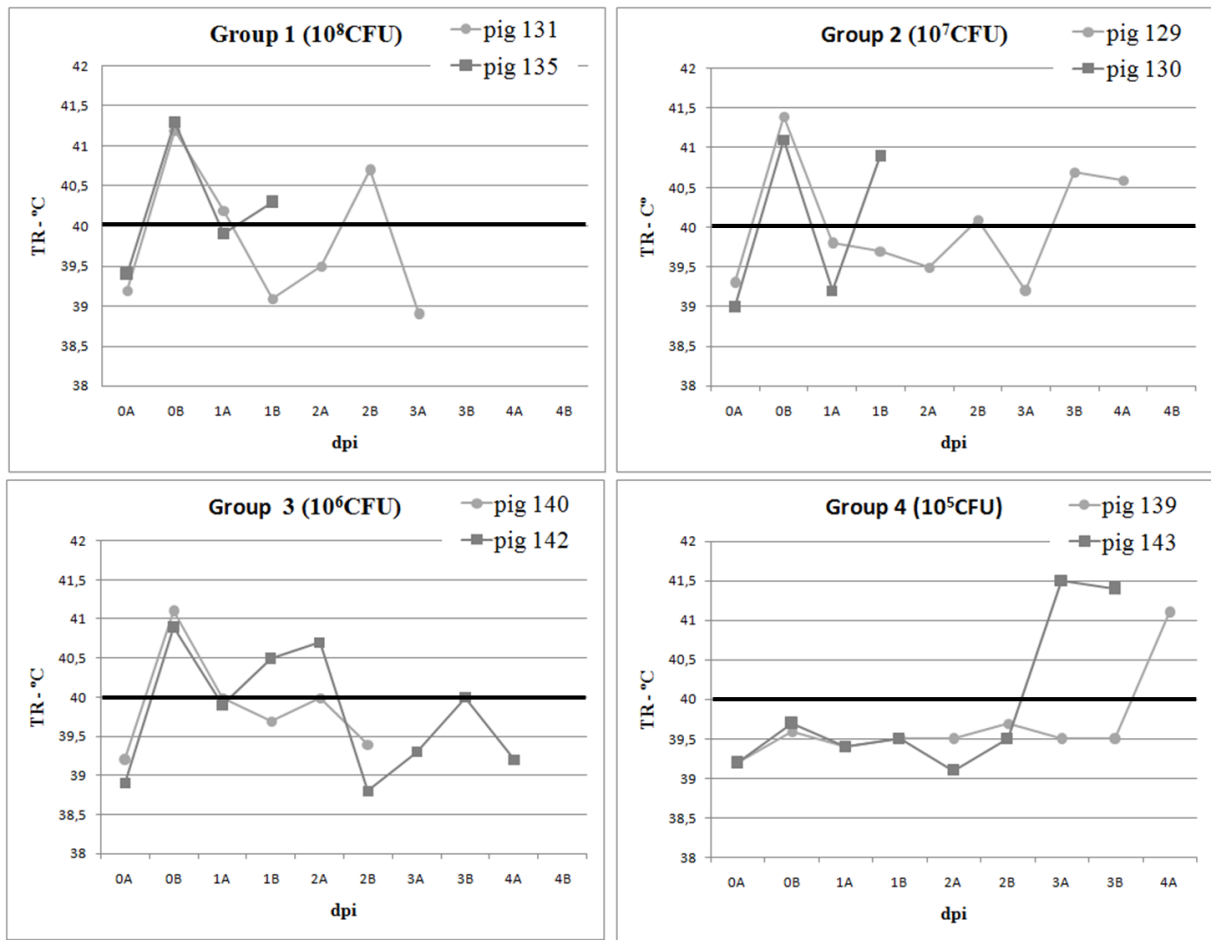
## 3. Results

All animals tested negative for all respiratory pathogens screened before inoculation.

The strain of *P. multocida* (#11246) used in this study was confirmed as type capsule A based on biochemical tests. Furthermore, as determined by PCR, this strain was positive for *hgbB* and *pfhA* genes and negative for *toxA* and *tbpA* genes.

### 3.1. Clinical signs

Due to animal welfare reason, five pigs with severe respiratory clinical signs were euthanized before the 4<sup>th</sup> dpi as follows: pigs 135 (G1) and 130 (G2) on the 1<sup>st</sup> dpi, pig 140 (G3) on the 2<sup>nd</sup> dpi and the pig 131 (G1) and 143 (G4) on the 3<sup>rd</sup> dpi. Fever and dyspnoea were observed in all challenged pigs. The rectal body temperature (**Fig. 1**) increased in the first 6 h after challenge in G1, G2 and G3, with subsequent oscillation between physiological temperatures (39.1 to 39.5°C) and hyperthermia (> 39.5°C) until euthanasia. In the G4 pigs, temperatures higher than 40°C were observed only on the 3<sup>rd</sup> dpi for pig 143 (41.5°C) and on the 4<sup>th</sup> dpi for pig 139 (41.1°C). In pigs of the G1 and G3 groups, dyspnoea was detected from the sixth hour post-inoculation until the 4<sup>th</sup> dpi, and in G2 dyspnoea was verified from the 1<sup>st</sup> to the 4<sup>th</sup> dpi. In G4, dyspnoea occurred later, from the 3<sup>rd</sup> to 4<sup>th</sup> dpi. Coughing was observed only in pig 129 of G2, from the 1<sup>st</sup> to 4<sup>th</sup> dpi.



**Fig. 1.** Rectal body temperature (RT) of pigs inoculated with *Pasteurella multocida* A, Group 1: 10<sup>8</sup> CFU (Colony Forming Unit) Group 2: 10<sup>7</sup> CFU; Group 3: 10<sup>6</sup> CFU; Group 4:10<sup>5</sup> CFU, A: first daily clinical evaluation (8-9 am), B: second daily clinical evaluation (4-5 pm).

### 3.2. Gross pathology

Suppurative cranioventral bronchopneumonia with pleuritis (**Figs. 2 and 3**) and fibrinous pericarditis (**Fig. 4**) were observed in all challenged pigs of G1, G2 and G3 (**Table 1**). In these pigs, the total area of bronchopneumonia, was more extensive, especially in pig 129 (G2). In G4, animal 139 had a discrete area of consolidation in the left cardiac lobe. In animal 143 (G4) only fibrinous pleuritis and pericarditis were observed. Locally extensive necrosuppurative pleuropneumonia, interpreted as *A. pleuropneumoniae*-like lesions, was observed in areas of cranioventral bronchopneumonia in pigs 131 and 135 of G1, and 129 of G2. Mediastinal lymph nodes of all pigs were enlarged, juicy and red.

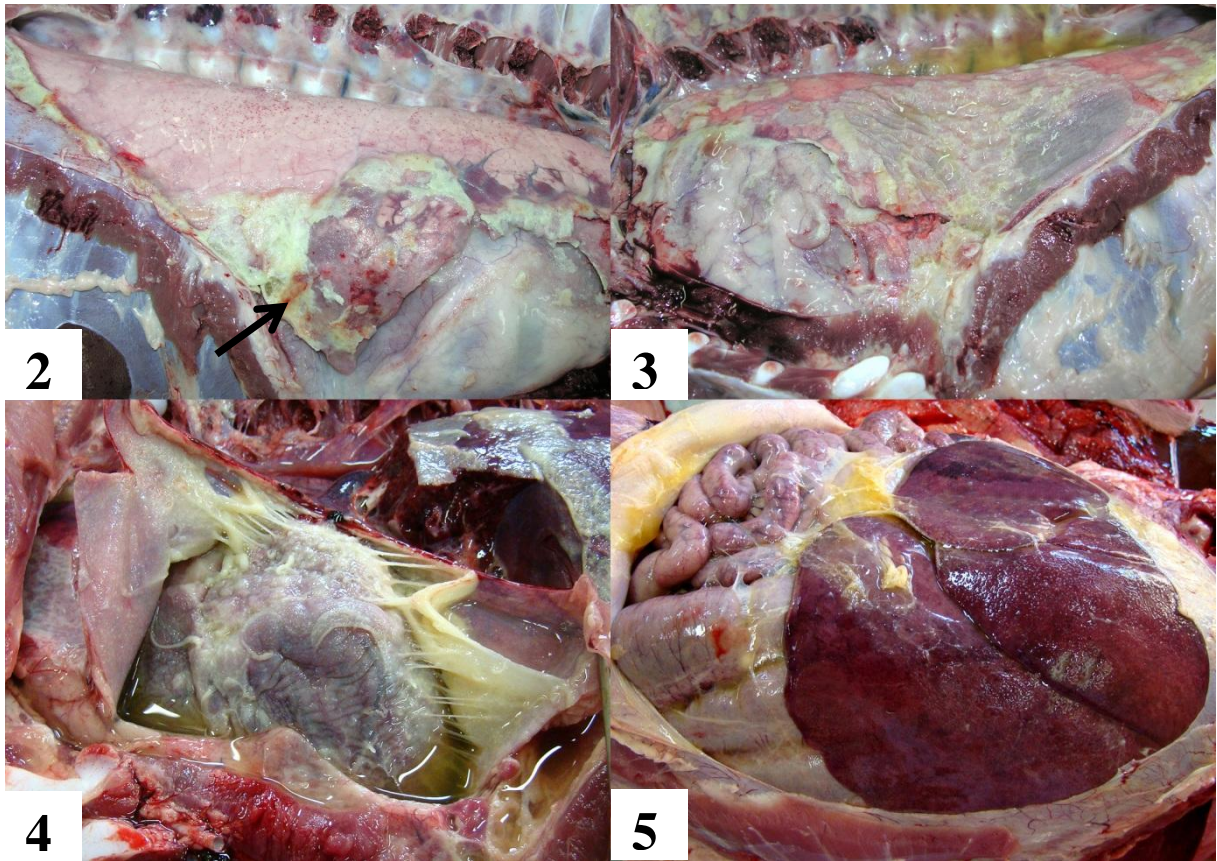
Fibrinous peritonitis was observed in pigs 130 (G2), 140 (G3) and 143 (G4) (**Fig. 5**). In addition, increased synovial fluid with cloudy appearance was verified in the tibio-fibulo-

tarsal joint of pig 140 (G3) and areas of splenic infarction in pig 143 (G4). For all challenged pigs, no macroscopic lesions were found in the myocardium, trachea, liver and kidneys.

Table 1: Number of pigs in each of four groups with macroscopic after intra-nasal challenge with *P. multocida* A strain 11246.

Lesion observed	<i>Pasteurella multocida</i> inoculation				
	group*				
	G1	G2	G3	G4	Control
Suppurative fibrinous pleuritis	2	2	2	1	-
Cranioventral suppurative bronchopneumonia	2	2	2	1	-
Locally extensive necrotic suppurative pleuropneumonia **	2	2	2	-	-
Fibrinous pericarditis	2	2	2	1	-
Suppurative lymphadenitis	2	2	2	2	-
Fibrinous peritonitis	-	1	1	1	-
Multifocal necrotizing hepatitis	1	1	1	1	-
Focal necrotic splenitis	-	-	-	1	-

Group 1:  $10^8$  CFU (Colony Forming Unit); Group 2:  $10^7$  CFU; Group 3:  $10^6$  CFU; Group 4:  $10^5$  CFU; \* Two pigs per group. \*\*Lesion *App like*; - Absence.



**Fig. 2.** Right lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *Pasteurella multocida* type A. Cranioventral suppurative bronchopneumonia with focally extensive fibrinous pleuritis (arrows); **Fig. 3.** Left lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *Pasteurella multocida* type A. Diffuse fibrinous pleuritis; **Fig. 4.** Pericardium sac and heart, pig 140 (group 3) inoculated with  $10^6$  CFU of *Pasteurella multocida* type A. Diffuse fibrinous pericarditis; **Fig. 5.** Abdominal cavity, pig 143 (group 4) inoculated with  $10^5$  CFU of *Pasteurella multocida* type A. Diffuse fibrinous peritonitis.

### 3.3. Histopathology

Fibrinosuppurative pleuritis (**Fig. 6**) and bronchopneumonia were observed in all challenged pigs of groups G1, G2 and G3. In addition, necrosuppurative bronchopneumonia (**Fig. 7**), characterized by areas of coagulative necrosis in the alveolar parenchyma, with abundant neutrophils, fibrin (**Fig. 7 Inset**) and bacteria and bacteria, was also observed in all animals of G1, G2 and G3. Some of these areas were surrounded by immature connective tissue. Lesions in the pleura and pericardium were characterized by abundant fibrinosuppurative exudate on serosa and, in some cases, the presence of immature connective tissue. In mediastinal lymph nodes there was congestion, oedema, mild haemorrhage and

numerous neutrophils. These lesions were especially located on the subcapsular and paratrabeular sinuses. In the liver lesions indicative of septic infarction were observed in at least one pig of from each group, characterized by random multifocal necrotizing hepatitis with fibrin thrombi in portal vessels and mild macrophage infiltration (**Fig. 8**).

In the kidneys, slight alterations consisting of interstitial haemorrhage and degeneration of tubular epithelium were observed in pigs 135 (G1) and 143 (G4). Fibrin thrombi were observed in the liver and spleen of pigs 135 (G1), 140 (G3) and 143 (G4). For all pigs, no gross and histological lesions were detected in the trachea and myocardium.

#### 3.4. Recovery of *P. multocida*

*P. multocida* type A was isolated from the lung tissue of all challenged pigs (Table 2). *P. multocida* A was also found, with highest frequency in the visceral portion of the pericardium sac (8/8), followed by the visceral pleura, trachea and spleen (7/8), the mediastinal lymph nodes and peritoneum swabs (6/8), the kidney (5/8) and the tibio-fibulo-tarsal joint of pig 140 of G3 (1/8). The growth of *P. multocida* A was dense and obtained in pure culture in all isolates.

All *P. multocida* A recovered colonies had similar characteristics to the strain used in the inoculum. The identity was confirmed by the following biochemical tests: positive to catalase, oxidase, indole, nitrate, glucose, saccharose, mannitol and hyaluronidase; and negative to urease, lactose and acriflavine.

#### 3.5. IHC

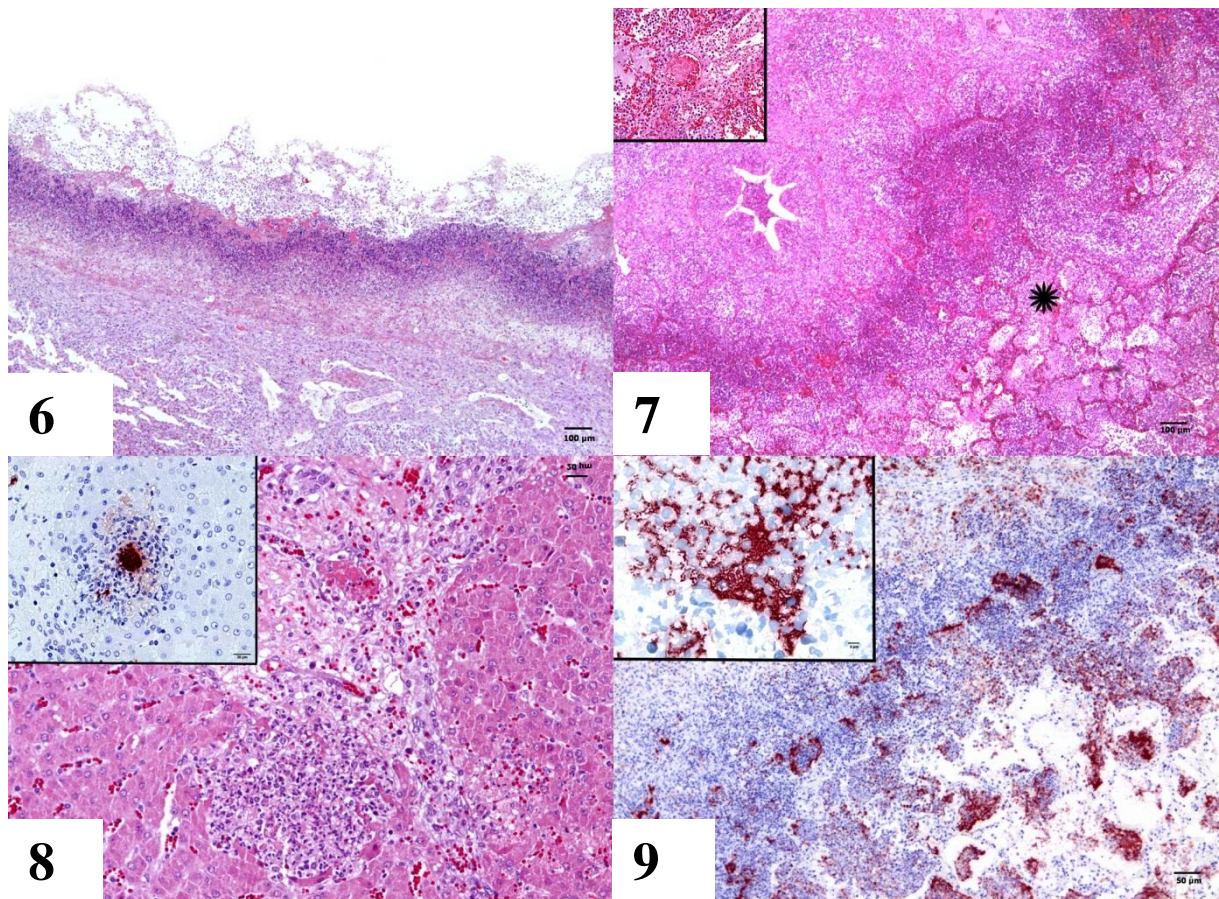
*P. multocida* antigen detected by IHC was located in several tissues (**Table 2**) with highest frequency in the lung and mediastinal lymph nodes (7/8), followed by the pericardium sac (5/8), the spleen, liver and kidney (4/8) and the trachea (3/8). There was no *P. multocida* labelling in the myocardium. Abundant labelling was registered in the lung, especially in the cytoplasm of neutrophils and free in the exudate of necrotic areas (**Fig. 9**). Also, abundant labelling of the *P. multocida* antigen was verified in the fibrinosuppurative exudate of the pericardium and pleura. Bacteria were seen in the lumen of blood vessels, in the trachea, kidney and liver (pigs 135, 140 and 143), in the spleen and pericardium (pig 135) and in the lymph node (pig 140), characterizing the septicaemia. In the liver, labelling was recorded in the lumen of blood capillaries and, in lower amounts, in the cytoplasm of macrophages in



necrotic lesions (Fig. 8 Inset) and in Kupffer cells. In the kidney, in addition to the antigen labelling in the lumen of the blood vessels mentioned above, there was also labelling in the cytoplasm of some macrophages and in the tubular interstitium in pig 130 (G2). In mediastinal lymph nodes the labelling occurred in the cytoplasm of some macrophages and in the lumen of capillaries and in the lumen of lymphatic and blood vessels.

The chi-square test showed an association between the IHC test and bacteriology results ( $p < 0.0001$ ) and the agreement between these tests was 77.9%. Adopting the bacteriology assay as a reference, the IHC test showed low sensitivity (71.8%) and moderate to high specificity (90%). Out of the 41 samples which tested positive for the detection of *P. multocida*, 68.3% (28/41) of the cases were positive by both techniques, 26.8% (11/41) only by bacterial isolation and 4.9% (2/41) only by IHC.

All tissue samples tested were negative for *M. hyopneumoniae*, influenza A virus and PCV2 antigens by IHC. The two control pigs remained healthy throughout the experiment, and none of the infectious agents investigated were found.



**Fig. 6.** Lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *Pasteurella multocida* type A. The pleura is thickened with a layer of fibrin, abundant neutrophils and necrotic debris. The underlying pulmonary parenchyma is atelectatic. HE. Bar, 100  $\mu\text{m}$ ; **Fig. 7.** Lung, pig 131 (group 1) inoculated with  $10^8$  colony forming units (CFU) of *P. multocida* type A. Suppurative bronchopneumonia with focally extensive area of coagulative necrosis within the pulmonary parenchyma (\*). The edges of the necrotic area contain a rim of degenerated inflammatory cells, mainly neutrophils. HE, Bar 100  $\mu\text{m}$ . **Inset:** a vessel is plugged with fibrin (fibrin thrombus); the interlobular septa is expanded by fibrin, and the alveoli are filled with neutrophils. HE. Bar 20  $\mu\text{m}$ ; **Fig. 8.** Liver, pig 135 (group 1) inoculated with  $10^8$  colony forming units (CFU) of *P. multocida* type A. Focus of coagulative necrosis in the liver associated with a thrombus (**arrow**). HE. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . **Inset:** Focal aggregate of *P. multocida* antigen within necrotic focus. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . Immunohistochemistry, labelled streptavidin biotin (LSAB) method with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) substrate, Mayer's haematoxylin counterstain; **Fig. 9.** Lung, pig 129 (group 2) inoculated with  $10^7$  colony forming units (CFU) of *P. multocida* type A. Abundant labelling of *P. multocida* antigen in the necrotic pulmonary parenchyma. Bar, 50  $\mu\text{m}$ . **Inset:** Distinct labelling of antigen free *P. multocida* and within the cytoplasm of neutrophils and macrophages. Bar, 5  $\mu\text{m}$ . Immunohistochemistry, labelled streptavidin biotin (LSAB) method with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) substrate, Mayer's haematoxylin counterstain.

Table 2. Number of pigs in each of four groups testing positive for *P. multocida* in bacteriological (BAC) and immunohistochemistry (IHC) tests following intra-nasal challenge with *P. multocida* A strain 11246.

<i>Pateurella multocida</i> inoculation Group*										
Clinical Samples	G1		G2		G3		G4		Control	
	BAC	IHC	BAC	IHC	BAC	IHC	BAC	IHC	BAC	IHC
Thoracic cavity fluid	2	ND	2	ND	2	ND	1	ND	0	0
Visceral pleura	2	ND	2	ND	2	ND	1	ND	0	0
Lung	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0
Pericardium	2	1	2	1	2	2	2	1	0	0
Trachea	2	1	2	0	2	1	1	1	0	0
Mediastinal lymph nodes	2	2	2	2	1	1	1	2	0	0
Abdominal cavity	2	ND	2	ND	1	ND	1	ND	0	ND
Liver	ND	1	ND	1	ND	2	ND	1	0	0
Spleen	2	1	1	1	2	1	2	1	0	0
Kidneys	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0
Tibio fibular tarsal joint	0	0	0	0	1	ND	0	ND	0	0

Group 1:  $10^8$  CFU (Colony Forming Unit); Group 2:  $10^7$  CFU; Group 3:  $10^6$  CFU; Group 4:  $10^5$  CFU; \*Two swine per group; ND: Not done.

#### 4. Discussion

Based on clinical and laboratorial findings of the present study we could demonstrate that *P. multocida* A act as the primary cause of respiratory disease in the experimental pigs from all infected groups, characterized by lung lesions and septicemia, with no association with other infectious agents such as *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, influenza virus A, PCV2 and PRRS.

In this study, the clinicopathological characteristics of fibrinous pleuritis, suppurative bronchopneumonia with or without necrosuppurative pleuropneumonia, pericarditis and septicaemia in pigs challenged by an intranasal drip of 3 ml of inoculum containing  $10^5 - 10^8$  CFU/ml we replicated. Although the experimental reproduction of pneumonia, septicaemia and arthritis after inoculation with *P. multocida* A had been previously reported (Ono et al., 2003), this was only possible through intratracheal inoculations containing  $3.6 \times 10^6 - 6.2 \times 10^{10}$  CFU/ml. Using the intranasal challenge with the same inoculum, these authors reproduced only histological lesions of exudative bronchopneumonia and fibrinous pleuritis. Other attempts of experimental reproduction of this infection challenging solely *P. multocida* and using other routes have not been successful (Ross 2007).

Since there was no established experimental model for this type of testing for pneumonia caused by *P. multocida* as the primary agent, there were no recommendations for the appropriate dose and route of inoculation. The choice of the dose was based on the results of previous experiments on pneumonia reproduction, even though they were not completely successful (Ono et al., 2003; Ross et al., 2007; Dagleish et al., 2010). In these experiments, dose concentrations were usually between  $10^6$  to  $10^9$  CFU and the most successful results were achieved using the intra-tracheal route. Based on the data available and on the previously work carried out by our group (Kich et al., 2007), concentrations of between  $10^5$ CFU to  $10^8$  CFU were used, and successful in dose  $10^6$  CFU and above.

Pigs challenged with inocula with higher bacterial concentration (G1, G2 and G3) developed pronounced clinical symptoms of pneumonia, characterized by severe dyspnoea, high hyperthermia and prostration six hours after inoculation with *P. multocida* A. The severity of the lesions in the pleura, pericardium and bronchopneumonia resulting in reduced air spaces explains these symptoms (López, 2007; Register et al., 2012; Vanalstine, 2012). Hyperthermia peak occurred within the first six hours in pigs of G1, G2 and G3 with some

oscillations in the physiological and temperature parameters. This is probably due to the compensatory mechanism of the body related to homeostasis (Bartfai and Conti, 2010). Dyspnoea and hyperthermia occurred later in pigs of group G4 (3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> dpi), but sufficiently severe to lead to the spontaneous death of pig 143 on the 3<sup>rd</sup> dpi. The importance of the dose used in the experiment model was best represented in G4, where clinical signs were delayed but profuse isolation of *P. multocida* from several tissues was observed, especially in pig 143. Over time, it is possible that the clinicopathological picture could evolve to the same levels observed in the other groups (G1, G2 and G3). Coughing was not a consistent clinical sign and this may be explained by the pathogenesis, wherein *P. multocida* A does not injure the epithelium of bronchi and bronchioles, in contrast to infections by *M. hyopneumoniae* and by the influenza A virus that have a tropism of the respiratory epithelium (DeBey and Ross, 1994; Gauger et al., 2012).

Necrosuppurative bronchopneumonia, fibrinosuppurative pleuritis and pericarditis prevailed in pigs challenged with all bacterial concentrations tested, except for G4 (Table 1). The pathological difference found between pigs challenged with the same inoculum concentration is probably derived from the individual response to the challenge. This was also evident in the IHC analysis, where even at low concentrations of inoculum, different labelling distribution of the *P. multocida* A antigen in lesions was observed. Additionally, it is possible that part of the inoculum had been swallowed by some animals during inoculation and thus the bacterial concentration effectively inoculated may have been lower than preconized. Considering the successful reproduction of pneumonia and the distribution of the bacteria in different tissues after challenge with *P. multocida* A strain 11246 by intranasal route, the use of inoculum doses of 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> CFU can be recommended. Even though there is no information in the literature regarding the minimum infectious dose under natural conditions, it is important to be clarify that the use of high doses of *P. multocida* are only possible under experimental conditions. Nevertheless, similar studies have not been successful with equivalent or higher doses in the reproduction of the disease, with *P. multocida* as the primary agent of pneumonia, pleurisy and septicaemia (Ross, 2007). These findings indicate the importance of the strain of *P. multocida* (strain #11246) used in the challenge and suggests the genetic diversity of circulating strains in pig herds with a direct influence on the pathogenicity of the bacteria (Moreno et al., 2003, Ewers et al. 2006, Marois et al., 2009, Pors et al., 2011).

As described above and in other studies (Pijoan and Fuentes, 1987; Ono et al., 2003), *P. multocida* A can induce pleuritis and pericarditis which leads to speculation that certain isolates of *P. multocida* A may play an important role in chronic lesions of pleurisy and pericarditis observed in pigs at slaughter (Jirawattanapong et al., 2010), which are responsible for significant economic losses. In our study, in addition to these lesions, *P. multocida* was also the cause of peritonitis and arthritis, demonstrating the importance of differentiating the diagnosis from that of polyserositis caused by *H. parasuis* (Aragon et al., 2012). As we did not find a clear pattern of injury in other organs among groups, further studies are necessary to clarify the methods of invasion of *P. multocida*.

At necropsy, locally extensive necrosuppurative pleuropneumonia was found in the pigs of G1 and in pig 129 of G2. However, microscopically, necrosuppurative bronchopneumonia was detected in all pigs in macroscopic areas of cranioventral bronchopneumonia, except those of G4. It is possible that the bacterial concentration is associated with the pathological alterations observed and with the evolution of the disease, including the case of the pigs in G4 group. These lesions are considered to be *A. pleuropneumoniae*-like, because they are similar to those produced by *A. pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2012) by means of RTX (repeats in the structural toxin) toxins (Frey, 2011). As described in this study, the lesions of pulmonary necrosis were predominantly suppurative, which differs from *A. pleuropneumoniae* which is predominantly haemorrhagic. Moreover, in these lesions induced by *P. multocida* A the presence of few oat cells was verified, which are abundant in lesions produced by *A. pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2012). *Actinobacillus pleuropneumoniae*-like pulmonary lesions associated with the isolation of *P. multocida* A and D and negative results for *A. pleuropneumoniae* have been reported in field studies (Cappuccio et al., 2004). The higher pathogenicity of this *P. multocida* A isolate and the development of *A. pleuropneumoniae*-like lesions may indicate possible genetic and virulence differences between distinct isolates (Davies et al., 2003; Ewers et al., 2006; Bethe et al., 2009; Pors et al., 2011b), which highlights the need for further studies on this topic.

*P. multocida* A strain 11246 showed a high tissue spreading rate, where the liver, kidney and spleen being important organs for detecting *P. multocida* in cases of sepsis in pigs, which conflicts with the results of Pors et al. (2011a). In the study reported herein, there was septicaemia at all inoculum concentrations, characterized by infarcts, mainly in the liver and spleen, and the presence of the bacterium in different organs detected by bacterial isolation

and IHC. Overall, bacterial isolation demonstrated higher levels of detection of *P. multocida* A when compared to IHC, with an agreement of 77.8% between the results of the two tests. Despite showing lower sensitivity than the bacteriological assay, the IHC test can be used to demonstrate the presence of bacteria in a lesion and it can be used as an additional tool for the study of the pathogenesis of *P. multocida* infection in pigs.

The occurrence of septicaemia has also been observed in infections with *P. multocida* serotype B in birds, buffaloes and pigs (Davies et al., 2003; Ewers et al., 2006). Septicaemia in pigs caused by *P. multocida* A has been described in a few experimental studies (Smith et al., 1973; Ono et al., 2003) and in cases of natural infections (Pijoan and Fuentes, 1987; Mackie et al., 1992; Cameron et al., 1996; Blackall et al., 2000; Thomson et al., 2001; Pors et al., 2011a). According to these publications, both experimental and natural infections have resulted exclusively in respiratory disease, and this may suggest the existence of strains expressing different determinants of pathogenicity, and some expressing factors determining the invasiveness of the bacteria.

The pleuropneumonia lesions found in this study, with the exception of *A. pleuropneumoniae*-like lesions, were similar to those found in cattle infected by *Mannheimia haemolytica* (formerly *Pasteurella haemolytica*) (Singh et al., 2011). These agents along with *P. multocida* A and *A. pleuropneumoniae* belong to the family *Pasteurellaceae*, suggesting a possible similarity of pathogenicity between these bacteria involving virulence factors. Among the virulence-associated genes of *P. multocida*, Ewers et al., (2006) reported that genes encoding *toxA*, *tbpA* and *pfhA*, as well as capsule biosynthesis genes, are potential genetic markers of pathogenicity. The isolate of *P. multocida* A used in this study contained the genes *pfhA* and *hgbB*, suggesting that these may be genetic markers of the pathogenicity of the bacterium. However, to prove it, it is necessary to compare the presence and functionality of these genes present in bacteria isolated from healthy and diseased pigs.

Historically, *P. multocida* has been considered as a secondary agent in the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) (Pijoan and Fuentes, 1987; Choi et al., 2003; Hansen et al., 2010). Several studies have been able to experimentally replicate pneumonia only when *P. multocida* A is associated with other infectious or non-infectious co-factors, such as influenza A virus and pseudorabies (SuidHerpesvirus 1), *M. hyopneumoniae*, *Ascaris suum*, fumonisin, high environmental levels of ammonia and anaesthetics (Ross, 2007). However, the sample of *P. multocida* A strain 11246 used in this study was the cause of severe

clinico-pathological condition associated with fibrinous pleuritis, suppurative bronchopneumonia and necrosuppurative pleuropneumonia in finishing pigs, in the absence of other pulmonary agents, being thus considered as the primary agent.

The lesions obtained by experimental reproduction were similar to those found in animals in the herd where the sample #11246 had been isolated. These results suggest that the strain had the same pathogenic characteristics under field and experimental conditions. However, this needs further investigation, since many aspects of the pathogenesis of *P. multocida* infection in pigs still remain unclear (Ewers et al., 2006; Bethe et al., 2009; García et al., 2011). Due to the similarities between the gross and microscopic lesions caused by *P. multocida* in the present study and those caused by other bacteria of the family *Pasteurellaceae* (*H. parasuis* and *A. pleuropneumoniae*), it is essential to perform laboratory tests to achieve a differential diagnosis. With the present infection model, further studies including a greater number of strains of *P. multocida* A can be carried out to identify phenotypic and genetic differences among strains involved in the pathogenesis of pneumonia in pigs.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship provided to João Xavier de Oliveira Filho; to Embrapa for funding the research project; to Dra. Márcia Cristina da Silva (Cedisa), Dra. Jalusa Deon Kich (Embrapa Swine and Poultry), Dr. Roberto M. Guedes (UFMG) and Dr. Ricardo Zenella (Early Investigator BJT/CNPq Embrapa Swine and Poultry) for intellectual support; and to Altair Althaus, Dejalmo A. da Silva, Franciele Ianiski, Franciana A. Volpato (Embrapa Swine and Poultry), and Kelen Ascoli (Cedisa) for valuable technical support.

### **Conflict of interest statement**

The authors have no competing interests.



## References

- Aragon, V., Segalés, J., Oliveira, S., 2012. Glässer's Disease. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G. W. (Eds.), Diseases of swine. 10<sup>th</sup> ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 760-769.
- Atashpaz, S., Shayegh, J., Hejazi, M.S., 2009. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. Research in Veterinary Science 87, 355-357.
- Bartfai, T., Conti, B., 2010. Fever. Scientific World Journal. 10, 490–503. doi: 10.1100/tsw.2010.50.
- Bethe, A., Wieler, L.H., Selbitz, H., Ewers, C., 2009. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. Veterinary Microbiology 139, 97-105.
- Blackall, P.J., Fegan, N., Pahoff, J.L., Storie, G.J., McIntosh, G.B., Cameron, R.D., O'Boyle, D., Frost, A.J., Bara, M.R., Marr, G. and Holder, J., 2000. The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis. Veterinary Microbiology 72, 111-120.
- Cameron, R.D., O'Boyle, D., Frost, A.J., Gordon, A.N. and Fegan, N., 1996. An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp *gallicida* in large pig herd. Australian veterinary journal 73, 27-29.
- Cappuccio, J., Leotta, G.A., Vigo, G., Moredo, F., Wolcott, M.J., Perfumo, C.J., 2004. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs with bronco and pleuropneumonia. In: International Pig Veterinary Society Congress, 18<sup>th</sup>, 2004, Hamburg/Germany. Proceedings v.1, p.205.
- Castro, L.A., Schuck, D., Mores, N., Zaha, A., Ferreira, H.B., Driemeier, D., 2009. Monospecific polyclonal antibodies for immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine pneumonic lungs. Veterinary Immunology and Immunopathology 128, 336-337.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. The Canadian Veterinary Journal 44, 735-737.
- Ciacchi-Zanella, J.R., Morés N., Simon N.L., Oliveira S.R., Gava D., 2006. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunoistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. (Identification of porcine circovirus type 2 by polymerase chain reaction and immunohistochemistry on archived porcine tissues since 1988

in Brazil). *Ciência Rural* 36, 1480-1485. (in Portuguese, with English abstract). ([http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_pdf&pid=S0103-84782006000500021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0103-84782006000500021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)).

Davies, R.L., MacCorquodale, R., Baillie, S., Caffrey, B., 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *Journal of Medical Microbiology* 52, 59-67.

DeBey, M., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection Immunity* 62, 5312-5318.

Ewers C., Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kießling, S., Filter, M., Wieler, L.H., 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology* 114, 304-317.

Falk, K., Høie, S., Lium, B.M., 1991. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. *Acta Veterinaria Scandinavica* 32, 67-77.

Frey, J., 2011. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Veterinary Microbiology* 153, 51-58.

García, N., Fernández-Garayzábal, J.F., Goyache, J., Domínguez, L., Vela, A.I., 2011. Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain. *Veterinary Record*. 169, 362-366.

Gauger, P.C., Vincent, A.L., Loving, C.L., Henningson, J.N., Lager, K.M., Janke, B.H., Kehrli, M.E Jr., Roth, J.A., 2012. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Veterinary Pathology* 49, 900-912.

Gottschalk, M., 2012. Actinobacillosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G. W. (Eds.), *Diseases of swine*. 10<sup>th</sup> ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 653-669.

Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L., 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology* 143, 120-131.

Høie, S., Falk, K., Lium, B. M., 1991. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. *Acta Veterinaria Scandinavica* 32, 395-402.

Jirawattanapong, P., Stockhofe-Zurwieden, N., Leengoed, L.V., Wisselink, H., Raymakers, R., Cruijssen, T., Peet-Schwering, C.V.D., Nielen, M., Nes., A.V., 2010. Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. *Research in Veterinary Science* 88, 11-15.

Kich, J.D., Mores, N., Triques, N.J., Nogueira, M.G., Locatelli, C., Klein, C.S., Felicio, R.P., 2007. *Pasteurella multocida* Tipo A atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? (Could *Pasteurella multocida* Type A act as the primary agent in cases of pneumonic pigs?). Comunicado Técnico n. 469, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, 7p. (in Portuguese). ([www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_x8g42b6i.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_x8g42b6i.pdf))

López, A., 2007. Respiratory System. In: McGavin, M.D., Zachary, J.F. (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. 4<sup>th</sup> edition, Elsevier, Philadelphia, PA, USA, pp. 463-558.

Ono, M., Okada, M., Namimatsu, T., Fujii, S., Mukai, T., Sakano, T., 2003. Septicaemia and arthritis in pigs experimentally infected with *Pasteurella multocida* capsular serotype A. *Journal of Comparative Pathology* 129, 251-258.

Mackie, J.T., Barton, M. and Kettlewell, J., 1992. *Pasteurella multocida* septicaemia in pigs. *Australian veterinary journal* 69, 227-228.

Moreno, A.M., Baccaro, M.R., Ferreira, A.J.P., De Castro, A.F.P., 2003. Use of Single-Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism for Typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* Isolates from Pigs. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1743-1746.

Marois, C., Fablet, C., Gaillot, O., Morvan, H., Madec, F., Kobisch, M., 2009. Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1830-1836.

Pijoan, C., Fuentes, M., 1987. Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191, 823-826.

Pors, S.E., Hansen, M.S., Bisgaard, M., Jensen, H.E., 2011a. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. *Veterinary Microbiology* 150, 160-166.

- Pors, S.E., Hansen, M.S., Christensen, H., Jensen, H.E., Petersen, A., Bisgaard, M., 2011b. Genetic diversity and associated pathology of *Pasteurella multocida* isolated from porcine pneumonia. *Veterinary Microbiology* 150, 354-361.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R., 1994. **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby-Year Book. 648 pp.
- Register, K.B., Brockmeier, S.L., Jong, M.F., Pijoan, C., 2012. Pasteurellosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G. W. (Eds.), *Diseases of swine*. 10<sup>th</sup> ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 798-810.
- Ross, R.F., 2007. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Animal Health Research Reviews* 7, 13-29.
- Singh, K., Ritchey, J.W., Confer, A.W., 2011. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial–Host interactions in bovine pneumonia. *Veterinary Pathology* 48, 338-348.
- Sørensen, V., Jorsal, S.E., Mousing, J., 2006. Diseases of the respiratory system. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D’Allarie, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 149-177.
- Smith, I.M., Betts, A.O., Watt, R.G. Hayward, A.H.S., 1973. Experimental infections with *Pasteurella multocida* (sero-group A) and an adeno- or enterovirus in gnotobiotic piglets. *Journal of Comparative Pathology* 83, 1-12.
- Thomson, J.R., Macintyre, N., Henderson, E.A.; Meikle, C.S., 2001. Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record*, 149,412-417
- Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y., Frost, A.J., Adler, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 924–929.
- Vanalstine, W.G., 2012. Respiratory System. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G. W. (Eds.), *Diseases of swine*. 10<sup>th</sup> ed., Ames, Wiley-Blackwell, Iowa, pp. 348-362.
- Vincent, L.L., Janke, B.H., Paul, P.S., Halbur, P.G ., 1997. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 191-195.

Yamaguti, M., Muller, E.E., Piffer, A.I., Kich, J.D., Klein, C.S., Kuchiishi, S.S., 2008. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 471-47.

#### 4. CAPÍTULO 3 – SEGUNDO ARTIGO

##### Diferentes perfis de patogenicidade entre isolados de *Pasteurella multocida* A na reprodução experimental de pneumonia e pleurite em suínos

###### Resumo

*Pasteurella multocida* A é um dos agentes bacterianos mais frequentes em lesões de broncopneumonia em suínos. No entanto, é questionável sua participação como agente primário dessas lesões. Neste contexto, associado com a diversidade genética de *P. multocida*, uma infecção experimental foi conduzida para estabelecer as características patológicas associadas às características fenotípicas e moleculares de oito isolados de *P. multocida* A obtidas de suínos com sinais clínicos e lesões de pneumonia. Na avaliação clínica e patológica dos animais desafiados, observou-se três padrões de lesões distintas, associadas ou não entre si: 1. broncopneumonia fibrinonecrótica cranioventral com pleurite fibrinosa (G1, G3, G7); 2. pleurite difusa uni ou bilateral, associada ou não com pericardite e peritonite (G3, G5, G7) e; 3. pleuropneumonia necrossupurativa focal, geralmente no lobo cardíaco (G1, G2; G3, G4, G7). A intensidade das alterações clinicopatológicas foi o critério de classificação dos isolados em: muito patogênicos (G1-11246, G2-11229, G3-16614 e G7-17044); pouco patogênicos (G4-16618 e G5-16972); e apatogênicos (G6-17034 and G8-17078). Não foi possível associar os padrões bioquímicos e a presença dos genes associados à virulência dos isolados com os padrões patológicos observados. No entanto, através dos padrões de PFGE obtidos após a macro-restrição com a *ApaI*, as cepas patogênicas (#11246, 11229, 16614, 16618, 16972 e 17044) pertenceram a um mesmo grupo com homologia variando de 89.2 a 100%, diferenciando das cepas apatogênicas (#17034 e 17078) que pertencem a outro grupo com homologia de apenas 63.5% com as demais amostras. Coletivamente, os resultados demonstraram padrões distintos de patogenicidade de diferentes cepas de *P. multocida* e este pode estar associado à característica genética de cepa.

## 1. Introdução

*Pasteurella multocida* A é um cocobacilo Gram-negativo pertencente à família *Pasteurellaceae*, que faz parte da microbiota residente do trato respiratório superior de animais sadios de diferentes espécies (Biberstein, 1990). Essa bactéria é um dos agentes bacterianos mais comumente isolado de pneumonia em suínos (Falk et al., 1991; Høie et al., 1991; Choi et al., 2003). Usualmente, *P. multocida* tem sido considerada agente secundário à pneumonia enzoótica causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pijoan and Fuentes, 1987; Hansen et al., 2010). Todavia, em condições naturais, o agente também já foi associado a pleurites, pericardites e septicemia (Pijoan and Fuentes, 1987; Pors et al., 2011) e pneumonia necro-hemorrágica, similar à causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, também denominada de “*A. pleuropneumoniae*-like” (Cappuccio et al., 2004).

A grande dificuldade da comprovação da atuação primária de *P. multocida* em pneumonias em suínos está em reproduzir a doença na ausência de co-fatores de infecção, sejam eles infecciosos ou não infecciosos (Ross, 2007). Poucos trabalhos tiveram sucesso na reprodução de pneumonias, pleuritis e septicemias através de desafios pela via intra nasal com repetidas doses de *P. multocida* pela via intratraqueal (Smith et al., 1973; Ono et al., 2003). Nosso grupo teve sucesso no desenvolvimento deste modelo, capítulo 2, o que possibilitou testar no hospedeiro diferentes a patogenicidade de diferentes cepas de *P. multocida* A.

É possível que a alta diversidade genética entre isolados de *P. multocida* associados a doenças respiratórias de suínos possa influenciar na patogenicidade do agente (Moreno et al., 2003, Marois et al., 2009, Pors et al., 2011). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar através da reprodução experimental a capacidade de diferentes isolados de *P. multocida* A em causar de forma primária pneumonia e pleurite em suínos obtidos de rebanho experimental com alto “*status*” sanitário, analisando características patológicas, fenotípicas e genotípicas das bactérias.

## 2. Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Suínos e Aves no sul do Brasil de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/CNPSA) (Protocolo 005/2010).

### *Animais*

Foram utilizados 76 suínos com peso médio de 74kg e idade média de 120 dias. Os animais foram obtidos de um rebanho com alto “*status*” sanitário localizado dentro das instalações do Centro de Pesquisa Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brasil. Este rebanho foi povoado no ano de 2009 com leitões obtidos por cesárea e produz leitões exclusivamente para uso em pesquisa. Semestralmente, testes laboratoriais são realizados para assegurar a ausência de infecção pelos principais patógenos respiratórios (*P. multocida* A e D, *Bordetella bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *M. hyopneumoniae* e vírus de influenza A). Além disso, doenças respiratórias como pneumonia enzoótica, influenza, polisserosite ou doença de Glässer, rinite atrófica, pleuropneumonia e pasteurelose nunca foram diagnosticadas no rebanho desde o povoamento da granja através de monitorias clínicas e testes laboratoriais (**Tabela 1**). O rebanho tem biossegurança estrita, barreiras sanitárias, salas fechadas com pressão interna positiva, restrição à visitação e monitoramento frequente.

### *Alojamento dos animais*

Os animais foram transferidos de uma unidade experimental à instalação de nível de biossegurança 2 localizada na sede do Complexo de Laboratórios de Sanidade Animal e Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brasil. Cada grupo foi acomodado em salas distintas com quatro baias cada (dois leitões por baia). Foram fornecidos ração e água *ad libitum*. O acesso aos animais foi permitido apenas aos executores do experimento. A temperatura interna de cada sala foi monitorada diariamente.

### *Cepas bacterianas*

Foram utilizados oito isolados de *P. multocida* tipo A pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Suínos e Aves. Estas cepas foram isoladas de suínos com doença respiratória severa oriundos de dois rebanhos de ciclo completo (cepas 11246 e 11229) e seis unidades de terminação (cepas 16614, 16618, 16972, 17034, 17044 e 17078) localizadas em seis Estados do Brasil (**Tabela 2**). Os suínos dos quais as cepas foram isoladas tinham entre 5 - 6 meses de idade. As amostras foram estocadas em caldo cérebro coração (BHI) (OXOID



LTD, Basingstoke, Hampshire, England) com adição de sangue ovino (1:1) e armazenadas a -70°C até utiliza-las nos desafios experimentais.

#### *Preparo do inóculo*

A recuperação da *P. multocida* A do estoque foi realizada pelo cultivo em placa de ágar sangue (Blood Agar Base, BD Difco™, 5% sangue ovino) incubada a 37°C por 18 - 24 horas. O subcultivo em placa de *Trypticase Soy Agar* (TSA) (Difco™) foi incubado a 37°C por 18 - 24 horas. Para o desafio, colônias bacterianas de terceira passagem foram utilizadas e o inóculo preparado em Tampão Fosfato Salina (PBS) estéril contendo 10<sup>7</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Tabela 1. Testes laboratoriais realizados em monitorias semestrais nos suínos do rebanho de origens dos animais experimentais utilizados no presente estudo, localizado na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina.

<b>Microorganismos</b>	<b>Amostras</b>	<b>Testes Laboratoriais</b>
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1. Suabes de Tonsilas 2. Soro	1. Nested PCR 2. Elisa
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	1. Suabes de tonsilas e de narinas 2. Suabes de Tonsilas	1. Isolamento bacteriológico* 2. PCR
<i>Haemophilus parasuis</i>	1. Suabes de tonsilas e de narinas	1. Isolamento bacteriológico*
<i>Pasteurella multocida</i>	1. Suabes de tonsilas e de narinas	1. Isolamento bacteriológico*
<i>Streptococcus suis</i>	1. Suabes de tonsilas e de narinas	1. Isolamento bacteriológico*
PRRS virus	1. Soro	1. Elisa
Influenza virus*	1. Soro	1. Elisa**

\*Isolamento bacteriológico – Cultura em duas placas de ágar sangue (AS) e uma placa de ágar MacConkey (Mc). Uma das placas de AS foram estriadas com *Staphylococcus aureus* e incubada em condições de microaerofilia à 37° C por 48h para crescimento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis*. Outra placa de AS e Mc foram incubadas à 37°C

por 24 h, para detecção de outras agentes bacterianos associados com doenças respiratórias. Todos os resultados para *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *P. multocida* e *S. suis* foram negativos.

NOTA: *Streptococcus* sp. tem sido isolada, porém, não foram classificados como *S. suis* através de testes bioquímicos adicionais.

\*\* Foram detectados a presença de anticorpos circulantes em níveis basais pelo teste de ELISA. Entretanto, não foi detectado material genético pelo teste de RT-PCR.

Tabela 2. Isolados de *Pasteurella multocida* A utilizados no desafio dos animais, obtidos de suínos na fase de terminação com 5 – 6 meses de idade.

Cepas*	Grupo**	Origem	Rebanho	Lesão***
11246	1	Rio Grande do Sul	Ciclo completo	Broncopneumonia
11229	2	Rio Grande do Sul	Ciclo completo	Broncopneumonia
16614	3	Minas Gerais	Terminação	Pleurite Fibrinosa
16618	4	Rio Grande do Sul	Terminação	Broncopneumonia
16972	5	Santa Catarina	Terminação	Broncopneumonia
17034	6	Paraná	Terminação	Pleuropneumonia necrossupurativa
17044	7	Goiás	Terminação	Broncopneumonia
17078	8	Mato Grosso	Terminação	Broncopneumonia

\* Cepas de *Pasteurella multocida* A; \*\* Foram utilizados oito animais por grupo; \*\*\*Local de isolamento da cepa de *P. multocida*.

### *Delineamento experimental*

Antes da inoculação, foram realizados dois suabes de cada leitão, um da tonsila palatina e um da cavidade nasal. Os suabes foram semeados utilizando métodos de rotina para isolamento de bactérias do trato respiratório de suínos (*A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* e *P. multocida*) (Quinn et al., 2011). A pesquisa de *M. hyopneumoniae* foi feita por Nested-PCR nos suabes de tonsila de acordo com Yamaguti et. al (2008).

O estudo foi conduzido em oito grupos experimentais (G1 – G8) com oito leitões cada. Cada grupo foi desafiado com diferente isolado de *P. multocida* A e outros 12 suínos foram mantidos em sala distinta e utilizados como controle negativo – G0. Cada suíno dos grupos G1 a G8 receberam 3,0 mL (1,5 mL / narina) do respectivo inóculo com  $10^7$  UFC/mL de *P. multocida*, administrado por gotejamento lento via intranasal com os animais na posição sentada. Para o G0, 3mL de PBS estéril (1,5 mL / narina) foi administrado. Os suínos foram avaliados clinicamente duas vezes por dia (8-9h e 16-17h), iniciando no 3º dia antes da inoculação até o 5º dia pós-inoculação (5dpi). Os parâmetros avaliados foram: temperatura

corporal retal com termômetro digital, dispneia (com animais deitados) e tosse (cinco minutos com os animais se movendo durante alimentação e limpeza da baia).

### *Necropsia e amostragem*

Os suínos foram sacrificados por eletrocussão, sangrados e necropsiados no 5ºdpi. Aqueles com sinais clínicos acentuados foram eutanasiados anterior ao período preconizado por razões de bem-estar animal. Na necropsia foram descritos o tipo, a distribuição e severidade das lesões. A porcentagem de pulmão com lesão macroscópica de pneumonia foi medida de acordo com escore de consolidação de cada lobo, onde 1 (1 - 25%); 2 (26 - 50%); 3 (51 - 75%), 4 (76 - 100%). A área total de pneumonia foi calculada utilizando a média de escores de cada lobo em relação à área total do pulmão como descrito por (Piffer e Brito, 1991). Pleurite foi classificada de acordo com a área total afetada, seguindo o escore: 1 (1-25%), 2 (26 - 50%), 3 (51 - 75%) e 4 (76 - 100%). Fragmentos de pulmão, traqueia, linfonodo mediastínico, saco pericárdico, fígado, rim e baço foram fixados em formaldeído a 10% tamponado para histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ). Fragmentos de pulmão, linfonodo mediastínico, fígado, rim, baço, suabes de articulação, saco pericárdico, pleura visceral e peritônio foram coletados assepticamente para testes microbiológicos. Exsudato mesclado com fibrina, quando presente na pleura, pericárdio, peritônio, traqueia e articulações também foram coletados. Estas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e conservados a 2-8°C para exame bacteriológico.

### *Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ)*

Os ensaios histopatológicos foram realizados por procedimentos de rotina e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Algumas preparações representantes de cada tipo de lesão encontrada foram selecionadas para ensaios de imuno-histoquímica para detecção de *P. multocida*. O ensaio foi feito pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase utilizando um kit comercial (Kit LSAB™ + System – HRP da Dako Cytomation™) e anticorpo policlonal hiperimune anti- *P. multocida* produzidos em ovinos.

Fragmentos de tecidos com 3-5 µm de espessura foram fixados em lâminas tratadas com poli-L-lisina, desparafinados e submetidos aos seguintes passos: recuperação de antígeno por

irradiação em microondas por 5 minutos a 700W, seguido de digestão enzimática com pepsina 0,04% (pH 8,0) a 37°C por 10 minutos; bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3,0%; incubação das seções a 37°C por 2h com o anticorpo primário policlonal anti- *P. multocida* na diluição 1:500; incubação a 37°C por 30 minutos com o complexo Kit LSAB™; revelação da reação com 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) a 37°C por 5 minutos e coloração de contraste com hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Foi empregado PBS (pH 7,4) nas lavagens entre cada passo.

Como controle positivo, foi utilizado fragmento de pulmão com lesão de pneumonia obtido por inoculação experimental com *P. multocida* tipo A utilizado na padronização do modelo de desafio. Como controle negativo foi utilizado fragmento de pulmão normal de suíno livre de patógenos específicos (SPF). Os resultados foram expressos de acordo com a presença ou ausência de antígeno marcado.

#### *Isolamento e identificação de P. multocida*

Tecidos, amostras de suabes e exsudatos dos animais necropsiados foram semeados em placas de ágar sangue e ágar MacConkey (Difco™) e incubados a 37°C por 18-24 horas sob condição aeróbica. Colônia nutris de *Staphylococcus aureus* foi adicionada nas placas de ágar sangue e estas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 24-48h. As amostras de *P. multocida* foram caracterizadas bioquimicamente de acordo com Quinn et al., (2011) para confirmação da espécie.

#### *Tipificação de P. multocida*

Os isolados de *P. multocida* utilizados nas inoculações dos animais (11246, 11229, 16614, 16618, 16972, 17034, 17044 e 17078) foram submetidos à caracterização fenotípica e molecular.

Os seguintes testes foram utilizados para caracterização fenotípica: sensibilidade à hialuronidase e precipitação da acriflavina; fermentação dos carboidratos (sorbitol, salicina, raffinose, arabinose, maltose, sacarose, lactose, xilose, glicose, trealose, manose, esculina, manitol e dulcitol); prova da oxidação e fermentação da glicose; produção de oxidase,

catalase, urease, gelatinase, indol e H<sub>2</sub>S; presença de motilidade; utilização do citrato e redução do nitrato. A caracterização molecular foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para tipificação da cápsula e detecção de genes associados à virulência (**Tabela 3**) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Brevemente, para caracterização molecular por PCR, o DNA foi extraído por processo de fervura. Bactérias de culturas *overnight* foram suspensas em 500 µL de solução salina e centrifugadas a 10.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 200 µL de água deionizada e congelado a -20°C por 10 minutos. Em seguida a suspensão foi aquecida a 98°C por 10 minutos em banho-maria e então centrifugada a 13.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 0,5 mL e armazenado a -20°C até o momento do uso.

#### *Análise de PCR e gel de eletroforese*

Os tipos capsulares A e D e o gene espécie-específico *kmt1* foram determinados por tipificação de cápsula por PCR multiplex e o sorotipo capsular F de *P. multocida* por PCR simples (Townsend et al., 2001). Os genes associados à virulência (VAGs) foram pesquisados por PCR multiplex (gene da toxina *toxA*, gene relacionado com aderência *pfhA*, genes relacionados com aquisição de ferro *tbpA* and *hgbB*) e PCR simples para o gene relacionado ao ferro *hgbA*; gene de superfície de membrana *oma87*, *ompH* e *ompA*; gene sialidase *nanB* e *nanH*.

Para análise da presença dos genes de aderência e formação de biofilme *tad* (*Putative nonspecific tight adherence protein*), foram desenhados sete sequências de *primers*, sendo o *tadA1*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG*. Todos os primers foram desenhados com base na sequência do *tad* locus da amostra PM36950 (GenBank). A amplificação dos genes através da PCR foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 30 ng de DNA do isolado, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 10x de taq buffer com 50 mM de KCl, 0,2 mM de cada dNTP e água ultra pura q.s.p.

Além dos genes citados a cima, foram realizadas PCR multiplex para pesquisa dos genes que codificam as RTX (*Repeats in the Structural Toxin*) de *A. pleuropneumoniae*

(*apxIA*, *apxIB*, *apxII* e *apxIII*) para verificar se estes genes estariam envolvidos com lesões de pleuropneumonia necro-supurativa tipo *A. pleuropneumoniae*-like.

As sequências de oligonucleotídeos dos *primers*, condições de amplificação, sequências referidas e referência seguida para metodologia do teste estão listadas na **Tabela 3**. Os produtos da amplificação foram misturados com 4 µL de tampão de carregamento e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

### PFGE

Os oito isolados de *P. multocida* A utilizados no desafio experimental foram caracterizados pela técnica de PFGE. Paralelamente, a técnica foi realizada em um isolado recuperado da pleura de cada grupo para assegurar que a *P. multocida* isolada era homóloga à inoculada. No G4, no qual não houve recuperação de *P. multocida* da pleura, a amostra utilizada foi isolada do pulmão.

O DNA genômico foi extraído de acordo com Marois et. al (2009) com pequenas modificações. Primeiramente, as cepas de *P. multocida* foram semeadas em ágar sangue (Difco™) e incubadas a 37°C *overnight*. Colônias foram coletadas em PBS e padronizadas para o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Uma alíquota de 200 µl da suspensão foi misturada com 15 µl (20 mg/ml) de proteinase K (Roche Applied Science) e incubada a 37°C por 30 minutos. Plugues de agarose foram feitos com uma mistura de 1% de agarose de baixo ponto de fusão (Roche™) e suspensão das células na proporção 1:1. Os plugues foram incubados em 5 mL de tampão de lise (1M Tris- HCl, 0.5 M EDTA, lauril sarcosine [10%] suplementado com 25 µl de proteinase K [20 mg/ml]) a 56°C por 2 horas. As células foram lavadas duas vezes com água destilada e 4 vezes com tampão TE 1X a 50°C por 10 minutos e armazenados em solução TE a 4°C. A digestão da restrição da endonuclease foi feita com a enzima *ApaI* (Roche™) de acordo com instruções do fabricante. Os fragmentos foram determinados pela PFGE com agarose 1% por eletroforese (Boehringer Mannheim) utilizando o sistema CHEF-DR III (Bio-Rad). Os parâmetros utilizados foram: 22 horas de tempo de corrida; 14°C de temperatura; 6V/cm de gradiente de voltagem; 120° de ângulo incluso com um segundo de tempo de pulso e 30 segundos de tempo de pulso final. Os géis foram corados com brometo de etídio (0.5µg/ml) por 20 minutos, sendo o excesso removido com água destilada e fotografados sob luz ultravioleta. O DNA digerido de *Salmonella enterica* sorotipo

Braenderup H9812 pela enzima *Xba*I (Roche™) foi utilizado para determinação do peso molecular.

Similaridades entre os perfis obtidos pelo PFGE foram baseados na comparação visual de padrões de bandas de isolados corridos no mesmo gel pelo uso do software BioNumerics (versão 3.0; Applied Maths). Semelhanças entre os padrões de fingerprints dos isolados foram determinados com base no coeficiente de correlação de Dice. O valor de tolerância da posição da banda foi de 1.7% (Carriço et al., 2005). O dendograma foi gerado pelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e os isolados foram considerados como tendo o mesmo pulsotipos quando o número e a localização das bandas eram indistinguíveis. Os isolados com uma diferença de banda foram considerados de pulsotipos distintos.

#### *Análise estatística*

A associação entre sinais clínicos e lesões macroscópicas observadas nos grupos foi analisada pelo teste exato de Fisher. O efeito do grupo na porcentagem de pulmão afetado por consolidação foi calculado por Kruskal-Wallis. Neste caso, uma análise detalhada foi feita utilizando o teste de Wilcoxon para comparar grupos 2 a 2. O software estatístico adotado foi o SAS versão 9.2 (2008).

Tabela 3: Sequência, especificidade e condições das PCR aplicadas na detecção de genes associados à virulência nos isolados de *P. multocida* utilizados no desafio dos animais.

Primer	Primers (5' – 3')	Gene	Nº. Acc.	Prod. (bp)	Condições da PCR (°C/s) <sup>a</sup>				Ref.
					Denat.	Anel.	Exten.	Ciclo	
KMT1 F	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	<i>KMT1</i>	AF016259	457	95/5'	55/30''	72/60''	30	Townsend et al., 2001
KMT1 R	GCTGTAAACGAACTCGCCAC								
CAPA F	TGCCAAAATCGCAGTCAG	<i>hyaD-hyaC</i>	AF067175	1,046	95/5'	55/30''	72/60''	30	Townsend et al., 2001
CAPA R	TTGCCATCATTGTCAGTG								
CAPD F	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	<i>dcbF</i>	AF302465.	648	95/5'	55/30''	72/60''	30	Townsend et al., 2001
CAPD R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG								
CAPF F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	<i>fcbD</i>	AF302467	851	95/5'	55/30''	72/60''	30	Townsend et al., 2001
CAPF R	TTCCGCCGTCAATTACTCTG								
PfhA F	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	<i>pfhA</i>	AY035342	276	94/45''	54/50''	72/50''	35	Ewers et al. (2006)
PfhA R	TGGTACATTGGTGAATGCTG								
HgbA F	TGGCGGATAGTCATCAAG	<i>hgbA</i>	AF331501.1	420	94/30''	55/30''	72/60''	35	Ewers et al., 2006
HgbA R	CCAAAGAACCACTACCCA								
HgbB F	TCATTGAGTACGGCTTGAC	<i>hgbB</i>	NC_002663.1	500	94/45''	54/50''	72/50''	35	Atashpaz et al. (2009)
HgbB R	CTTACGTCAGTAACACTCG								



Cont. Tabela 3

Primer	Primers (5' – 3')	Gene	Nº. Acc.	Prod. (bp)	Condições da PCR (°C/s) <sup>a</sup>				Ref.
					Denat.	Anel.	Exten.	Ciclo	
TbPA F	T*GGTTGGAAACGGTAAAGC	<i>tbpA</i>	NZ_CM002276.1	728	94/45''	54/50''	72/50''	35	Ewers et al. (2006)
TbPA R	TAACGTGTACGGAAAAGCC*								
ToxA F	T*TCTTAGATGAGCGACAAGG	<i>toxA</i>	NC_017027.1	867	94/45''	54/50''	72/50''	35	Lichtensteiger et al. (1996)
ToxA R	GAATGCCACACCTCTATAG								
OmpA F1	GGTGAGCGCGTAGATTACAGA	<i>ompA</i>	NC_017764.1	303	94/45''	54/50''	72/50''	35	This study
OmpA R1	GTTAGCCACAGTGTCAGCAC								
OmA87 F	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC	<i>Oma87</i>	NZ_CM002276.1	2376	94/30	55/30	72/60	35	Ewers et al., 2006
OmA87 R	TTAGAACGTCCCACCAATGCTG								
OmpH F	CGCGTATGAAGGTTTAGGT	<i>omph</i>	NZ_CM001580.1	439	94/45''	54/50''	72/50''	35	Ewers et al., 2006
OmpH R	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC								
nanB F	GTCCTATAAAGTGACGCCGA	<i>nanB</i>	NZ_CM002276.1	585	94/45''	54/50''	72/50''	35	Ewers et al., 2006
nan B R	ACAGCAAAGGAAGACTGTCC								
nan H F	GAATATTTGGGCGGCAACA	<i>nanH</i>	NZ_CM002276.1	361	94/45''	54/50''	72/50''	35	Ewers et al., 2006
nan H R	TTCTCGCCCTGTCATCACT								

Cont. Tabela 3

Primer	Primers (5' – 3')	Gene	Nº. Acc.	Prod. (bp)	Condições da PCR (°C/s)				Ref.
					Denat.	Anel.	Exten.	Ciclo	
TadA F	GGTCGCATCACGAGGACTAT	<i>tadA</i>	PM36950	172	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadA R	AGGCGAAATTACGATGCAAG								
TadB F	TTCGCCTAATTGTCCCGTTA	<i>tadB</i>	PM36950	150	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadB R	TGGAAGTTAGGGCAATACCG								
TadC F	GTGACCAAAAGCTTCACACG	<i>tadC</i>	PM36950	221	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadC R	GGGATTGCAGTTTTGCTGAT								
TadD F	TCGCAACCGCTAATCGACAA	<i>tadD</i>	PM36950	1274	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadD R	GCGGCTTTAAAACAAGTGCC								
TadE F	TGGATTCGTCCCAAGAGAAC	<i>tadE</i>	PM36950	195	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadE R	ATCTCTCCTACGGGGAGTCG								
TadF F	GATCTAATCAGCCCCGTTGA	<i>tadF</i>	PM36950	183	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadF R	TATCATTGGCGATTGTACGC								
TadG F	AACTTGCCCAATTGTTCTCG	<i>tadG</i>	PM36950	224	95/30''	55/30''	72/60''	35	Moraes et al., (Dados não publicados)
TadG R	CCTTCTGGTTGGACTTCTGC								

Cont. Tabela 3

Primer	Primers (5' – 3')	Gene	Nº. Acc.	Prod. (bp)	Condições da PCR (°C/s) a				Ref.
					Denat.	Anel.	Exten.	Ciclo	
APXIAF	ATCGAAGTACATCGCTCGGA	<i>apxIA</i>	X52899	723	94/30"	60/30"	72/3'	35	Rayamajhi et al., 2005
APXIAR	CGCTAATGCTACGACCGAAC								
APXIBF	TTATCGCACTACCGGCACTT	<i>apxIB</i>	X68595	811	94/30"	60/30"	72/3'	35	Rayamajhi et al., 2005
APXIBR	TGCAGTCACCGATTCCAATA								
APXIIF	GAAGTATGGCGAGAAGAACG	<i>apxII</i>	AY736188	965	94/30"	60/30"	72/3'	35	Rayamajhi et al., 2005
APXIIR	CGTAACACCAGCAACGATTA								
APXIIIF	GCAATCAGTCCATTGGCGTT	<i>apxIII</i>	X80055	396	94/30"	60/30"	72/3'	35	Rayamajhi et al., 2005
APXIIIR	GACGAGCATCATAGCCATTC								
APXIVF	GCGAAACAATTCGAAGGG	<i>apxIV</i>	AF021919	1600; 2000; 2400 e 2800*	94/30"	60/30"	72/3'	35	Rayamajhi et al., 2005
APXIVR	GGCCATCGACTCAACCAT								

Desnaturação inicial para todos os PCRs: 94°C/3 min; Extensão final para todos os PCRs: 72°C/10 min.; \*Diferentes produtos amplificados de acordo com o sorotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*: 1600pb (sorotipos 4, 9 e 11); 2000pb (sorotipo 6); 2400pb (sorotipos 1, 3, 12, 13 e 14) e 2800pb (sorotipos 2, 5a, 5b, 7, 8, 10 e 15 ).

## 2. Resultados

### *Sinais Clínicos*

No período anterior ao desafio não houve alteração clínica nos animais experimentais. Hipertermia (temperatura retal  $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ) e dispneia foram os sinais clínicos mais frequentemente apresentados pelos animais dos grupos desafiados (**Tabela 4**). Observou-se maior intensidade e prevalência desses sinais nos suínos dos grupos G1, G3 e G7 ( $p \leq 0,001$ ), com início às seis horas após infecção e persistindo até a eutanásia. A temperatura retal média e os respectivos erros padrão dos animais desses grupos após o desafio foi de  $40,44^{\circ}\text{C} \pm 0,11$  (G1),  $40,42^{\circ}\text{C} \pm 0,19$  (G3) e  $40,29^{\circ}\text{C} \pm 0,16$  (G7), não diferindo entre si ( $p > 0,05$ ). Todavia, alguns animais desses grupos apresentaram picos de febre superiores a  $41^{\circ}\text{C}$ . Alguns suínos dos grupos G2, G4 e G5 também apresentaram febre e dispneia, no entanto, com menor número de animais acometidos, o que interferiu na média do grupo que foi de  $39,79^{\circ}\text{C} \pm 0,20$ ,  $39,53^{\circ}\text{C} \pm 0,16$  e  $39,72^{\circ}\text{C} \pm 0,14$ , respectivamente. A temperatura retal média dos grupos G0, G6 e G8 permaneceram dentro da normalidade,  $38,97^{\circ}\text{C} \pm 0,06$ ,  $39,01^{\circ}\text{C} \pm 0,04$  e  $39,05^{\circ}\text{C} \pm 0,05$ , respectivamente, não diferenciaram entre si ( $p > 0,05$ ).

A ocorrência de tosse, apesar de apresentar diferença estatística entre os grupos, foi um evento esporádico e leve. Além dos sinais clínicos de hipetermia e dispneia, dois animais do G7 apresentaram sinais de otite interna, caracterizada pela cabeça inclinada, em posição pendular, iniciando no 1ºdpi em um animal e no 3ºdpi no outro. Outro sinal comumente observado foi vômito nos suínos dos grupos G1, G2, G3, G5 e G7 entre 1ºdpi ao 4ºdpi. Os suínos dos grupos G0 (controle), G6 e G8 não apresentaram alteração clínica.

Tabela 4: Percentagens de suínos com sinais clínicos e lesões em função do grupo.

Variáveis	Grupos†									P*
	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	
<b>Sinais Clínicos</b>										
Hipertermia	0.00b	100.0a	62.50ab	100.0a	75.00ab	75.00ab	12.50b	100.0a	25.00b	<0.0001
Dispneia	0.00c	100.0a	37.50b	87.50ab	0.00bc	25.00bc	0.00bc	100.0a	0.00bc	<0.0001
Tosse	16,67 b	50,00 ab	37,50 ab	12,50 b	0,00 b	37,50 ab	0,0 b	87,50 a	0,00 b	<b>0,0002</b>
<b>Lesões</b>										
<b>Macroscópicas</b>										
CP crânio-ventral**	0,00 c	62,50 ab	37,5,00 ab	87,50 a	12,50 b	0,00 bc	0,00 bc	75,00 a	0,00 bc	<b>&lt;0,0001</b>
CP crânio-ventral (%)***	0.00±0.00b	3.58±1.51ab	2.53±1.43ab	6.26±2.38a	1.30±1.30b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	5.01±1.58a	0.000±0.00b	0,0004
Nódulo necrótico	0,00 c	62,50 a	37,50 ab	75,00 a	0,00 bc	0,00 bc	0,00 bc	37,50 ab	0,00 bc	<b>&lt;0,0001</b>
Peritonite Fibrinosa	0,00 d	62,50 a	12,50 bcd	37,50 ab	25,00 abc	50,00 ab	0,00 cd	50,00 ab	0,00 cd	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Microscópicas</b>										
Pleuropneumonia fibrinonecrossupurativa / fibrinonecrohemorrágica	0,00 c	87,50 a	50,00 ab	87,50 a	0,00 bc	0,00 bc	0,00 bc	75,00 a	0,00 bc	<b>&lt;0,0001</b>
Pleuropneumonia fibrinossupurativa	0,00	0,00	0,00	0,00	12,50	0,00	0,00	12,50	0,00	0,7074
Pleurite fibrinosa difusa	0,00 c	50,00 ab	0,00 bc	75,00 a	0,00 bc	25,00 abc	0,00 bc	50,00 ab	0,00 bc	<b>&lt;0,0001</b>
Pleurite fibrinosa focal discreta	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,50	0,00	12,50	0,00	0,7074
Pericardite fibrinosa difusa	0,00 c	25,00 abc	25,00 abc	62,50 a	0,00 bc	25,00 abc	0,00 bc	37,50 ab	0,00 bc	<b>0,0029</b>
Linfadenite supurativa	0,00 c	12,50 bc	37,50 ab	75,00 a	12,50 bc	12,50 bc	0,00 bc	37,50 ab	0,00 bc	<b>0,0005</b>

\* Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher, cobrindo a diferença entre os grupos de 0 a 8 com o grau de confiança de 5%; percentagens seguidas de letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste exato de Fisher ( $P \leq 0.05$ ); \*\* Broncopneumonia supurativa na histopatologia; \*\*\* A consolidação pulmonar foi medida pela porcentagem total da área pulmonary afetada. Descritivo nível de probabilidade de Kruskal-Wallis; Medianas seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Wilcoxon ( $p \leq 0.05$ ); † G0 com 12 leitões e G1-G8 com oito leitões em cada grupo; Febre: Temperatura retal  $\geq 40,0^{\circ}\text{C}$ .

## Lesões

Devido à intensidade dos sinais clínicos observados, por questões humanitárias, um total de 16 animais, dos grupos G1 (5/8), G3 (6/8) e G7 (5/8), foram eutanasiados entre o 2ºdpi e 5ºdpi e outros três, dos G2 (1/8) e G5 (2/8), no 4ºdpi. Todos os demais foram eutanasiados no 5ºdpi, como preconizado. As lesões encontradas estão descritas na **Tabela 4**. As principais alterações observadas foram broncopneumonia cranioventral (consolidação pulmonar); pleuropneumonia fibrinonecrosupurativa/fibrinonecro-hemorrágica; pleurite fibrinosa difusa (**Figura 1**) ou focal (**Figura 2**) e pericardite fibrinosa. Entre os grupos, foram observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) na frequência e extensão da broncopneumonia cranioventral, pleuropneumonia fibrinonecrosupurativa/ fibrinonecro-hemorrágica (**Figura 3**), pleurite fibrinosa difusa, pericardite fibrinosa (**Figura 4**), linfadenite supurativa e peritonite (**Figura 5**).

A maior porcentagem média de área pulmonar afetada esteve presente nos animais do G3 (6.26%), seguido pelos G7 (5.01%), G1 (3.58%), G2 (2.53%) e G4 (1.30%). Essa lesão, na histologia, apresentaram-se como broncopneumonia supurativa ou fibrinossupurativa, com presença de grande quantidade de neutrófilos e colônias bacterianas no lúmen dos brônquios e bronquíolos. Diversos animais dos grupos G1, G2, G3, G4 e G7 apresentaram lesões de pleuropneumonia fibrinonecrosupurativa ou fibrinonecro-hemorrágica, caracterizada por necrose de coagulação do parênquima pulmonar (**Figura 7**), com exsudação inflamatória supurativa intralveolar (**Figura 9**) e com a presença de material proteináceo, fibrina, neutrófilos e colônias bacterianas no lúmen alveolar e necrose da parede dos vasos, podendo haver áreas multifocais de hemorragia. A presença de neutrófilos modificados com alongamento do núcleo necrótico (*oat cells*), foi observada em pouca quantidade nestas áreas necróticas em alguns animais dos grupos G3, G4 e G7. A pleura visceral e os septos interlobulares adjacentes apresentavam-se expandidos por fibrina, neutrófilos degenerados e múltiplas colônias bacterianas. Os vasos linfáticos dos septos interlobulares e das áreas de necrose estavam distendidos e obliterados por trombos de fibrina.

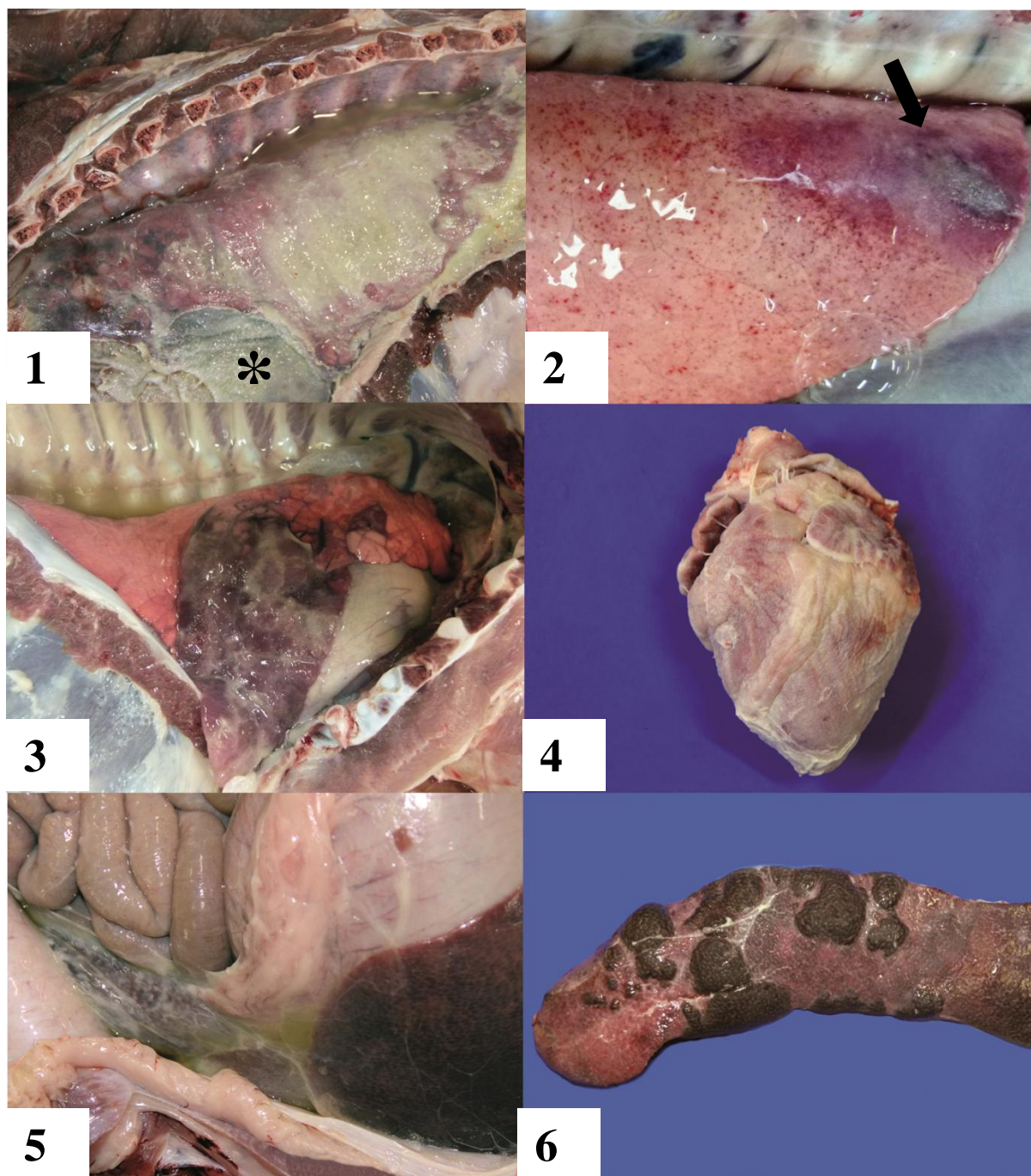
Pleurite fibrinosa foi frequente, com extensão variável entre os grupos ( $p < 0.0001$ ) (**Table 4**). Destas, 41.94% (13/31) foram focais e 58.06% (18/31) difusas. Todas as pleurites focais ocorreram de forma unilateral e sempre adjacentes às lesões no parênquima pulmonar, quando presente. Dentre as difusas, 33.33% (6/18) foram unilaterais e 66.66% (12/18)

bilaterais. Quanto à extensão, pleurites focais foram classificadas como escore 1 e nas pleurites difusas, os escores observados foram de 2 e 4. Pleurite fibrinosa difusa foi observada em suínos dos grupos G1, G3, G5 e G7, geralmente associada à pericardite fibrinosa. Um suíno do grupo G1, G2 e G3 e três do G5 apresentaram apenas pleurite difusa e um suíno do G5 que apresentou pleurite focal sem lesão do parênquima pulmonar. Na histologia dos animais afetados, verificou-se pleura espessada por fibrina, fibroblastos, neutrófilos degenerados e múltiplas colônias bacterianas. O saco pericárdico estava distendido por neutrófilos e fibrina.

A presença de linfadenite supurativa foi frequente, com exceção dos animais dos grupos G6 e G8. Essa lesão foi caracterizada pela presença de neutrófilos, fibrina e seios paratrabeculares distendidos por edema proteico.

Em alguns suínos dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G7 foi observada peritonite e um suíno do G1 e dois do G5 apresentaram microtrombos sépticos no baço. Além disso, foram observadas, em um animal de cada grupo, hepatite necrótica (G1, G3 e G7), esplenite necrótica (G1, G5 e G7), infarto esplênico (G5: **Figura 6**) e nefrite linfoplasmocitária (G0, G2, G4, G5 e G8). Otite interna foi confirmada pela presença de exsudato purulento nos dois suínos do G7 que apresentavam sinais clínicos sugestivos.

Resumidamente, foram observados três padrões de lesões distintos, associados ou não entre si: 1. broncopneumonia fibrinonecrótica cranioventral com pleurite fibrinosa (G1, G3, G7); 2. pleurite fibrinosa difusa uni ou bilateral, associada ou não com pericardite e peritonite (G3, G5, G7) e; 3. pleuropneumonia necrossupurativa focal, geralmente no lobo cardíaco direito (G1, G2; G3, G4, G7). Nos suínos dos grupos G6, G8 e do grupo controle (G0) não foram observadas lesões macro e microscópicas.



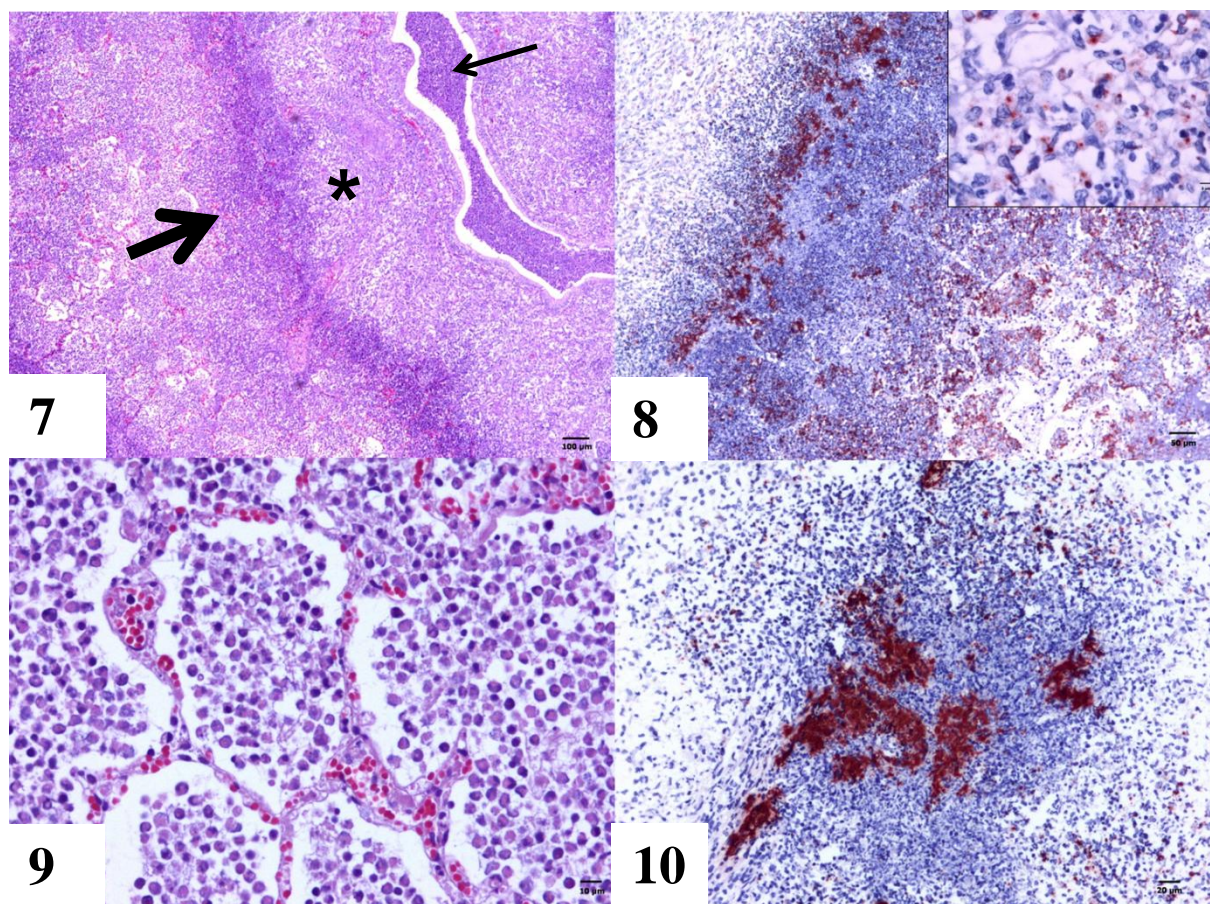
**Figura 1.** Cavidade torácica, suíno 378 (grupo 7) inoculado com a cepa 17044 de *Pasteurella multocida* A. Pleurite e pericardite (\*) fibrinosas difusas; **Figura 2.** Pulmão, suíno 296 (grupo 5) inoculado com a cepa 16972 de *Pasteurella multocida* A. Pleurite fibrinosa focal (seta) na região dorso-caudal do lobo diafragmático esquerdo; **Figura 3.** Pulmão, suíno 190 (grupo 2) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Pleuropneumonia hemorrágica focalmente extensa no lobo cardíaco direito; **Figura 4.** Coração, suíno 212 (grupo 3) inoculado com a cepa 16614 de *Pasteurella multocida* A. Pericardite fibrinosa difusa; **Figura 5.** Cavidade Abdominal, suíno 212 (grupo 3) inoculado com a cepa 16614 de *Pasteurella multocida* A. Peritonite fibrinosa; **Figura 6.** Baço, suíno 285 (grupo 5) inoculado com a cepa



16972 de *Pasteurella multocida* A. Múltiplos infartos esplênicos com filetes de fibrina sobre a cápsula

### *IHQ*

A marcação de *P. multocida* pela IHQ foi detectada em grande quantidade nas áreas de broncopneumonia necrossupurativa (**Figura 8**), principalmente no citoplasma de células fagocitárias (**Figura 8 Insert.**) e livres no exsudato inflamatório. Nas áreas de broncopneumonia supurativa, pouca a moderada quantidade de bactéria foi observada no exsudato da luz dos brônquios e bronquíolos e nos septos interlobulares. Abundante marcação também foi observada no exsudato fibrinosupurativo da pleura e pericárdio. Houve marcação moderada no citoplasma de macrófagos e no exsudato necrótico no interior das criptas das tonsilas e em macrófagos e neutrófilos dos linfonodos mediastínicos. Nos rins, baço e fígado a marcação foi apenas discreta no interior de macrófagos. Em uma área de infarto séptico no baço houve intensa marcação da bactéria (**Figura 10**). Além disso, *P. multocida* também foi encontrada, em pouca quantidade, no lúmen vascular do pulmão, coração, linfonodos mediastínicos e baço de alguns animais.



**Figura 7.** Pulmão, suíno 190 (grupo 2) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Área de necrose de coagulação no parênquima pulmonar (\*), circundada por abundantes células inflamatórias, discreta proliferação de tecido conjuntivo (**seta grossa**) e conteúdo muco purulento no bronquíolo (**seta fina**). HE. Bar, 100  $\mu$ m; **Figura 8.** Pulmão, suíno 190 (grupo 2) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Abundante marcação de antígeno de *P. multocida* (**marcação de cor vermelha**) na área de necrose de coagulação no pulmão e entre as células inflamatórias degeneradas. Bar, 50  $\mu$ m. **Inset:** Região da necrose de coagulação no pulmão com marcação de antígeno de *P. multocida* (**pontos vermelhos**) no citoplasma de células fagocitárias. Bar, 5  $\mu$ m. Imuno-histoquímica, método da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB™) com o substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) e contra coloração pela Hematoxilina de Mayer's; **Figura 9.** Pulmão, suíno (190) inoculado com a cepa 11229 de *Pasteurella multocida* A. Abundante exsudação inflamatória, predominantemente supurativa, intralveolar, em área de necrose de coagulação no parênquima pulmonar. HE. Bar, 10  $\mu$ m; **Figura 10.** Baço, suíno (grupo 5) inoculado com a cepa 16972 de *Pasteurella multocida* A. Abundante marcação de antígeno de *P. multocida* (**marcação de cor vermelha**) em área de necrose. Bar, 20  $\mu$ m. Imuno-histoquímica, método da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB™) com o substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) e contra coloração pela Hematoxilina de Mayer's.

### *Recuperação de Pasteurella multocida*

A recuperação de *P. multocida* nos diferentes tecidos dos animais desafiados está descrita na **Tabela 5**. Houve diferença ( $p \leq 0.05$ ) na recuperação de *P. multocida* entre os grupos. A maior frequência de recuperação da bactéria ocorreu nos animais dos grupos G1 (100%), G3 (100%) e G7 (87.5%). Também houve diferença ( $p \leq 0.05$ ) entre os grupos nas amostras de pulmão, saco pericárdico, pleura, traqueia, linfonodo mediastínico e peritônio. A maior frequência de recuperação da *P. multocida* foi de tecidos lesados da cavidade torácica (pulmão, pericárdio, pleura, traqueia e linfonodos mediastínicos) nos animais dos grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G7. Fora da cavidade torácica a bactéria foi isolada no fígado, baço e rim de animais dos grupos G1, G3, G5 e G7, da articulação tíbio-tarso-femoral em dois animais (G5 e G7) e no exsudato purulento do ouvido interno nos dois animais do G7 que apresentaram sinais clínicos de otite. A bactéria não foi recuperada dos animais dos grupos G6 e G8 e dos suínos do G0.

Tabela 5. Percentagens de suínos com recuperação de *Pasteurella multocida* A em função do grupo.

Amostras	Grupos†									P*
	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	
Isolamento do animal	0.00d	100.0a	37.50bc	100.0a	12.50cd	37.50bc	0.00cd	87.50ab	0.00cd	<0,0001
Pulmão	0.00c	87.50a	37.50ab	87.50a	12.50bc	37.50ab	0.00bc	87.50a	0.00bc	<0,0001
Pericárdio	0.00b	12.50ab	0.00ab	50.00a	0.00ab	25.00ab	0.00ab	50.00a	0.00ab	0,0009
Pleura	0.00d	62.50ab	12.50bcd	87.50a	0.00cd	25.00bcd	0.00cd	50.00abc	0.00cd	<0,0001
Traqueia	0.00b	37.50a	12.50ab	50.00a	12.50 ab	25.00 ab	0.00 ab	25.00 ab	0.00 ab	0,0383
Linfonodo mediastínico	0.00bc	62.50ab	25.00b	100.0a	0.00b	25.00b	0.00b	37.50b	0.00b	<0,0001
Peritônio	0.00b	37.50a	0.00ab	50.00a	0.00ab	12.50ab	0.00ab	12.50ab	0.00ab	0,0039
Baço	0,00	25,00	0,00	12,50	0,00	12,50	0,00	12,50	0,00	0,3717
Fígado	0,00	25,00	0,00	12,50	0,00	12,50	0,00	12,50	0,00	0,3717
Rim	0,00	25,00	0,00	12,50	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,1188
Articulação	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,50	0,00	12,50	0,00	0,7074

\* Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher, cobrindo a diferença entre os grupos de 0 a 8 com o grau de confiança de 5%; percentagens seguidas de letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste exato de Fisher ( $P \leq 0.05$ ); † G0 com 12 leitões e G1-G8 com oito animais em cada grupo;

## Tipificação de *Pasteurella multocida*

### Caracterização fenotípica

Todos os oito isolados usados para o desafio foram classificados como *P. multocida* sorotipo A através do teste positivo de hialuranidase e negativo para precipitação de acriflavina. Ainda, os isolados foram imóveis, produtores de indol, não produziram enxofre; catalase e oxidase positivos; apresentaram metabolismo fermentativo na utilização da glicose como substrato; não degradaram a gelatina; não utilizaram o citrato e ureia como substrato; utilizaram o sorbitol, sacarose, glicose, manose, manitol e nitrato como fonte de energia e foram negativos no teste de fermentação da arabinose, lactose, esculina e dulcitol. A utilização da salicina, rafinose, maltose, xilose e trealose como carboidratos apresentou resultados variados entre os isolados (dados não demonstrados), porém não foi observada a formação de um padrão entre os isolados.

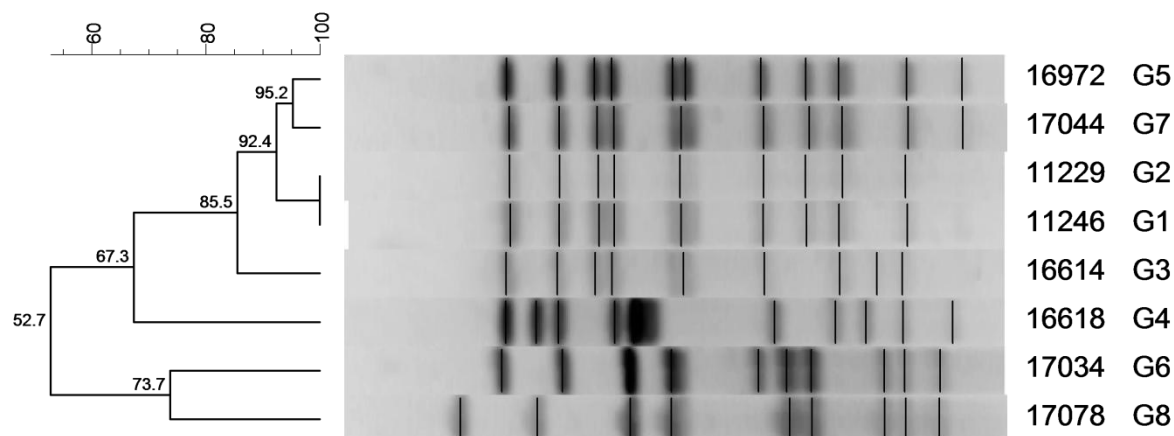
### Caracterização genotípica

O gene *kmt* espécie específica para *P. multocida* foi detectado em todos os isolados, confirmando a identidade da bactéria. Em todas as amostras testadas detectou-se a presença dos genes *hyaD-hyaC* (*P. multocida* A) e ausência dos demais genes relacionados à cápsula lipoproteica da bactéria (*dcbF* and *fcbD*). As oito amostras utilizadas nesse estudo apresentaram a maioria dos genes associados à virulência pesquisados (*pfhA*, *hgbA*, *hgbB*, *ompA*, *oma87*, *ompH*, *nanB*, *nanH*, *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG*). Em nenhum dos oito isolados foram detectados os genes *tbpA*, *toxA* e para as RTXs (*apxI*, *apxII* e *apxIII*).

### PFGE

Os padrões de PFGE obtidos após a macro-restrição com a *ApaI* foram caracterizados por 09 – 11 bandas e dois padrões foram detectados nos oito isolados utilizados (**Figura 11**). As amostras (G1-11246, G2-11229, G3-16614, G4-16618, G5-16972 e G7-17044) pertencem a um grupo com homologia variando de 67,3 a 100%. As amostras 17034 (G6) e 17078 (G8)

apresentaram homologia de apenas 52,7% com as demais amostras e assemelharam-se em 73,7% entre si. Os isolados de *P. multocida* utilizados nos inóculos e os seus respectivos isolados dos animais desafiados apresentaram o mesmo padrão.



**Figura 11.** Padrões gerados pela macrorestrição pela *ApaI* visualizados por eletroforese em campo pulsado (PFGE - pulsedfield gel electrophoresis) de oito cepas de *Pasteurella multocida* A [11246 (G1); 11229 (G1); 16614 (G1); 16618 (G1); 16972 (G1); 17034 (G1); 17044 (G1) e 17078(G1)] utilizadas no desafio experimental em suínos.

### 3. Discussão

Em várias regiões do Brasil, problemas severos de pneumonia afetando animais na fase de terminação são comuns. Os surtos cursam com alta mortalidade e morbidade (superiores a 5%) e associados à febre, dispneia severa e frequente evolução para óbito. Na necropsia, muitas vezes são encontradas lesões de abundante efusão pleural e extensa broncopneumoia supurativa, com isolamento de *P. multocida*, associado ou não à outros agentes, sem saber a importância patológica no desenvolvimento das lesões. Em alguns casos, ocorrem focos de pleuropneumonia necrohemorrágica referidas como "*A. pleuropneumoniae like*", em função da semelhança com as lesões de infecção com o *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kich et al., 2007). As oito cepas utilizadas no presente estudo foram obtidas de rebanhos que apresentavam estas características clínicas e de lesões. Neste trabalho, demonstrou-se que algumas destas cepas de *P. multocida* A foram capazes de atuar como causa primária de broncopneumonia e serosite em suínos, tendo inclusive cursado com septicemia, como também demonstrado por Smith et al., (1973), enquanto outras foram apatogênicas.

Tradicionalmente, *P. multocida* A tem sido considerada como agente secundário no complexo das doenças respiratórias dos suínos - CDRS (Morrison et al., 1985, Pijoan and Fuentes, 1987; Choi et al., 2003; Jordan et al., 2006, Hansen et al., 2010, Opriessnig et al., 2011). Em contraste, são muito raras as descrições de casos suspeitos de atuação da bactéria como agente primário de infecção pulmonar (Ono et al., 2003).

O objetivo central do nosso trabalho foi o de evidenciar a presença de diferentes perfis patogênicos da bactéria, incluindo a indução de lesões septicêmicas e focos necrohemorrágicos no pulmão. Considerando os resultados clínicos e patológicos, foram encontrados três perfis para os oito diferentes isolados de *P. multocida* A utilizados: isolados muito patogênicos (G1-11246, G2-11229, G3-16614 e G7-17044); pouco patogênicos (G4-16618 e G5-16972); e apatogênicos (G6-17034 and G8-17078). A provável razão para isto pode estar na diferença genética dos isolados, pois no teste de PFGE, as amostras apatogênicas apresentaram o perfil mais distante das demais. Isso evidencia que cepas geneticamente diferentes de *P. multocida* podem estar circulando nos rebanhos brasileiros de suínos e pode ser uma das razões para a particular importância da doença no país e as dificuldades encontradas para o seu controle.

Da mesma forma que o observado em condições naturais de infecção à campo, os sinais clínicos que melhor caracterizaram pasteurelose nos animais desafiados foram hipertemia alta, dispneia com respiração abdominal com maior severidade e frequência nos animais inoculados com os isolados mais patogênicos (G1, G3 e G7) (**Tabela 4**). Os isolados que não provocaram alterações clínicas, também não causaram lesões nos suínos desafiados (G6-17034 e G8-17078). No entanto, isolados pouco ou não patogênicos podem ter importante papel como oportunistas no agravamento das lesões causadas por outros agentes, como observado no CDRS (Hansen et al., 2010, Fablet et al., 2012). Os resultados clínicos evidenciaram que a dispneia (respiração abdominal) foi mais importante e frequente do que a tosse nos surtos em que a amostra de *P. multocida* demonstrou alta patogenicidade, em contraste com a infecção por *M. hyopneumoniae* e por influenza A, nos quais os sinais de tosse são preponderantes (DeBey e Ross, 1994; Gauger et al., 2012).

As principais lesões encontradas foram broncopneumonia supurativa/ fibrinossupurativa, pleuropneumonia necrossupurativa/necro-hemorragica, pleurite e pericardite, também encontradas por Ono et al., (2003), Cappuccio et al., (2004) e López, (2007). *P. multocida* tem sido associada a extensas áreas de consolidação pulmonar, principalmente em co-infecção com *M. hyopneumoniae* (Fablet et al., 2012). Nos animais que apresentaram as lesões de

consolidação pulmonar, estas foram pouco extensas, porém houve isolamento de *P. multocida* A e visualização de pouca a moderada quantidade de antígeno no exsudato da luz dos brônquios e bronquíolos e nos septos interlobulares. Possivelmente, lesões mais extensas de consolidação pulmonar por *P. multocida* vão estar presentes em casos de infecções mistas como as observadas no PRDC (Fablet et al., 2012) e não na infecção primária, como demonstrado. No presente estudo, nenhum dos animais apresentou lesões de hipertrofia do tecido linfoide associado aos bronquíolos (reação de BALT), o que sugere a ausência de infecção simultânea com *M. hyopneumoniae*. De maneira geral, o quadro clínico e patológico observado se assemelha muito com as alterações patológicas encontradas na manheimiose pneumônica em bovinos, forma pulmonar de pasteurelose causada por *Mannheimia haemolytica* (anteriormente denominada de *Pasteurella haemolytica*). Nesta, as lesões são sempre crânio-ventrais e se caracterizam por broncopneumonia fibrinosa com pleurite fibrinosa proeminente e efusão pleural. No presente estudo, áreas de necrose de coagulação delimitada por poucos neutrófilos degenerados (*oats cells*) foram observadas. Estes neutrófilos degenerados, causadas pela infecção com *P. multocida* A, são discretas quando comparada com lesões causadas por *A. pleuropneumoniae* (López, 2007).

*P. multocida* tem sido frequentemente associada com pleurite em animais abatidos (Jirawattanapong et al., 2010). Nesse estudo, a intensidade e frequência de lesões fibrinosas nas serosas, especialmente na pleura, pericárdio e efusão pleural é um ponto relevante, pois pode explicar parte das pleurites e pericardites crônicas observadas no abate. Extensas áreas de pleurite fibrinosa foram constantes nos suínos desafiados com os isolados mais patogênicos. Muitos deles também apresentaram pericardite e peritonite, o que demonstra o tropismo da bactéria por serosas. Ainda, alguns animais dos grupos G1, G2, G3 e do G5, apresentaram apenas pleurite fibrinosa, associada ou não a pericardite fibrinosa, sem afecção do parênquima pulmonar. Estas lesões se assemelham às causadas por *H. parasuis* na doença de Glässer (Vahle et al., 1995). Além do *H. parasuis*, as lesões macro e microscópicas causadas por esses isolados de *P. multocida* A podem se assemelhar às causadas por outras bactérias da família *Pasteurellaceae* (*M. haemolytica*, *M. hyorhinis* e *A. pleuropneumoniae*). Por isso, é imprescindível, em casos clínicos de broncopneumonia e serosite a campo, confirmar o diagnóstico através de exames laboratoriais. Para tal, devem ser encaminhadas ao laboratório amostras de pulmão lesionado e exsudatos pleural e do pericárdio. Adicionalmente, pode ser realizada uma análise clínica na granja de origem dos lotes afetados, realizando uma complementação da análise clínica e epidemiológica.



Historicamente, as lesões relatadas em associação com a infecção por *P. multocida* eram de broncopneumonia supurativa e pleurite, geralmente associadas a agentes de infecção primária com *M. hyopneumoniae* e Influenza. Em 2004, Cappucio et al. (2004) descreveram uma nova forma de apresentação severa de infecção por *P. multocida* em granjas na Argentina, com lesões fibrinosas severas e focos de lesões pulmonares necrohemorrágicos. Após a descrição desse caso na Argentina, formas similares de pneumonia/pleurite/pericardite foram registradas em granjas no Brasil e vem se tornando progressivamente mais frequentes e severas (observação dos autores). Pleuropneumonia necrossupurativa/neco-hemorragica ocorreu nos suínos inoculados dos grupos G1, G2, G3 e G7, com localização predominante no lóbulo cardíaco direito. Na IHQ, foi observada intensa marcação de antígeno de *P. multocida* nessas áreas, principalmente no citoplasma de células fagocitárias e livres no exsudato destas lesões. Consideradas como lesões do tipo "*A. pleuropneumoniae*-like", essas são semelhantes às produzidas por *A. pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2012) por meio das RTX (Frey, 2011). No entanto, não foram encontrados os genes que codificam essas toxinas nos isolados de *P. multocida* desse estudo. Assim, *Pasteurella multocida* A deve utilizar outra rota de patogenia para provocar essas lesões. Foram detectados por PCR 15 genes para fatores de virulência nas amostras usadas no desafio. Entretanto, nenhum destes foi associado anteriormente com a indução de lesões necro-hemorragicas como as encontradas nas reproduções experimentais. Interessantemente, como descrito acima, as lesões causadas pela *P. multocida* A são semelhantes às acarretadas por outros agentes da família *Pasteurellaceae* como *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* e *M. haemolytica*, o que sugere uma possível rota de patogenia em comum. Novos estudos de expressão gênica poderão definir melhor estas relações.

Mesmo que a forma septicêmica da infecção pela *P. multocida* seja relatada como uma característica do sorotipo B, afetando pássaros, búfalos e suínos (Davies et al., 2003; Ewers et al., 2006), alguns estudos demonstraram a ocorrência de septicemia pelo sorotipo A (Smith et al., 1973; Pijoan and Fuentes, 1987; Mackie et al., 1992; Cameron et al., 1996; Blackall et al., 2000; Thomson et al., 2001; Ono et al, 2003; Pors et al., 2011). Septicemia também foi observada no presente estudo, tanto pela visualização pela IHQ de *P. multocida* no lúmen vascular do pulmão, coração e linfonodos mediastínicos, como pelo isolamento da bactéria em diversos tecidos parenquimatosos (pulmão, coração, linfonodo mediastínicos, fígado, baço e rins) e serosas (**Tabela 4**). A presença da bactéria no local de lesão, associada à ausência do gene *toxA*, sugere que essa toxina não está envolvida na patogenia como já descrito (Davies et al., 2003).

Ainda não estão claros os fatores associados à virulência da *P. multocida* em casos de pneumonias e pleuritis em suínos (Ewers et al., 2006, Bethe et al., 2009), diferente do papel das toxinas RTX nas lesões de pleuropneumonia necrohemorrágica causada pelo *A. pleuropneumoniae* (Frey, 2011). Acredita-se haver um papel preponderante dos lipopolissacarídeos da parede celular em induzir uma resposta inflamatória do hospedeiro (Fernandez de Henestrosa et al., 1997). Além destes, a cápsula da bactéria está claramente envolvida na evasão da fagocitose e resistência ao complemento (Anderson et al., 1984; Snipes e Hirsh, 1986; Truscott e Hirsh, 1988; Hansen e Hirsh, 1989; Harmon et al., 1991; Prumboom et al., 1996). Já com relação à patogenia da forma invasiva da infecção pela *P. multocida*, existem poucas informações. Os mecanismos de invasão da mucosa, resistência à imunidade inata e a forma como causa doença sistêmica não estão claramente elucidados. Foram encontrados nas amostras de desafio 15 genes já relacionados com virulência em *P. multocida*, por isso não pode ser afastada a possibilidade da associação de alguns genes ou de uma combinação entre os mesmos na patogenia da forma invasiva de infecção. Possivelmente, testes de funcionalidade gênica pode demonstrar alguma associação desses com a doença.

A diversidade genética entre amostras de *P. multocida* obtidas de casos de pneumonias em suínos tem sido investigada usando diferentes técnicas moleculares (Pijoan et al. 1983, Zhao et al., 1992, Blackall et al., 2000 e Rubies et al., 2002). No entanto, nenhum desses estudos examinou a possibilidade de associação entre os genótipos e achados patológicos. Pelo estudo dos genes associados à virulência, as oito amostras de *P. multocida* utilizadas nesse estudo apresentaram a maioria dos genes pesquisados, com exceção do *toxA* (que codifica a toxina associada à *P. multocida* em casos de Rinite Atrófica Progressiva) e do *tbpA* (aquisição de ferro). Como todas as amostras de *P. multocida*, inclusive as amostras apatogênicas, contém os genes codificadores de proteínas responsáveis pela adesão a células, sobrevivência no hospedeiro e evasão do sistema imune, se faz necessário estudar a estrutura genética e funcionalidade desses VAGs, pois a PCR demonstra apenas a presença de uma região amplificada do gene, o que não significa que o mesmo é ativo ou está sendo expresso. Adicionalmente, é possível que existam outros genes associados à virulência, ainda não identificados. Assim como ocorreu no estudo dos VAGs, as características fenotípicas das oito cepas utilizadas no desafio não foram relacionadas com os padrões patológicos desenvolvidos.

Na análise por PFGE, Pors et al. (2011) demonstraram alta diversidade genética de amostras de *P. multocida* A em lesões de broncopneumonias em suínos utilizando a enzima

de restrição *ApaI*. O mesmo estudo demonstrou, através da técnica de MSLT (*Multilocus sequence typing*), um baixo número de clones, o que sugere uma possível origem comum entre as amostras. No presente estudo, o método de PGFE foi eficaz em diferenciar as amostras de *P. multocida* de acordo com as alterações clínicas e patológicas, através da macro-restrição pela enzima *ApaI*, formando dois grupos maiores, sendo um composto pelas amostras patogênicas [11246 (G1), 11229 (G2), 16614 (G3), 16618 (G4), 16972 (G5) e 17044 (G7)] e outro por amostras não patogênicas [17034 (G6) e 17078 (G8)] (**Figura 11**). As amostras patogênicas (11246, 11229, 16614, 16618, 16972 e 17044) pertencem a um grupo com homologia variando de 67,3 a 100%, não diferenciando as amostras muito patogênicas [11246 (G1), 11229 (G2), 16614 (G3) e 17044 (G7)] da amostra pouco patogênicas 16972 (G5). A cepa utilizada no G5 foi classificada como pouco patogênica pelo número de animais afetado (3/8). No entanto, lesões severas de pleurite fibrinosa difusa associado à pericardite fibrinosa foram observado em dois suínos. Ainda, um desses suínos apresentou lesão de pleuropneumonia fibrinosa difusa. Com isso, possivelmente a cepa 16972 (G5) seja muito patogênica, explicando o agrupamento com os isolados muito patogênicos no PFGE. O fato de ter afetado apenas 3 animais pode ser devido a deglutição do inóculo no procedimento de inoculação ou até mesmo outro fator relacionado a colonização da bactéria no hospedeiro. O isolado 16618 (G4), classificado como pouco patogênico, se distanciou das demais amostras patogênicas, apresentando uma homologia de 67,3%. As amostras não patogênicas 17034 (G6) e 17078 (G8) apresentaram homologia de apenas 52,7% com o grupo patogênico e de 73,7% entre si. Assim, como também evidenciado por Marois et al., (2009), *ApaI*-PFGE demonstrou ser uma ferramenta útil para o rastreamento epidemiológico de infecções por *P. multocida*. As amostras patogênicas apresentaram alta homologia entre si e foram mais distintas das amostras não patogênicas. Isso evidencia claramente a diversidade genética entre isolados de *P. multocida* testados nesse trabalho. Portanto, nos rebanhos brasileiros de suínos, provavelmente estão circulando amostras de *P. multocida* com diferentes perfis de patogenicidades e capacidade de atuar como causa primária de pneumonias, serosites e septicemia.

No Brasil, existe uma ocorrência significativa de pneumonias e pleurites em suínos na fase de terminação, com características de alta mortalidade e lesões septicêmicas, incluindo lesões de pneumonia necro-hemorrágica, pleurite e pericardite. Esses problemas vem se apresentando de forma crescente, com dificuldades de controle, principalmente em função das restrições ao uso de terapia com antibióticos na proximidade do abate e proibição do uso de outros (Comunicação pessoal de Médicos Veterinários que atuam no campo). A proposta do

presente estudo foi demonstrar diferenças de patogenicidade entre isolados de *P. multocida* isoladas destes tipos de surtos vistos no campo, associando com características fenotípicas e moleculares. A hipótese da existência de amostras com capacidade patológica para suínos na ausência dos principais patógenos respiratórios (*M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *B. bronchiseptica*, vírus da influenza suína, PCV2 e PRRS) foi confirmada. O teste de PFGE, através da enzima *Apa I*, diferenciou as amostras patogênicas das não patogênicas, demonstrando assim a presença de diferentes clusters de *P. multocida* relacionados à patogenicidade da bactéria. Diferente do padrão tradicional das lesões induzidas pela *P. multocida*, foi demonstrado que algumas amostras podem atuar como agente primário causando pneumonia, serosites e pleuropneumonia necrossupurativa ("*A. pleuropneumoniae like*") em suínos. Adicionalmente, algumas amostras causaram septicemia e outras exclusivamente lesões de pleurite, sem evidências de pneumonia. Coletivamente, estes resultados indicam a necessidade de exames laboratoriais para definir a etiologia dos casos de pneumonia/pleurite/pericardite que ocorrem em suínos na fase final de terminação e de novos estudos para uma definição mais completa da patogenia das diferentes formas de infecção pelo agente.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de João Xavier de Oliveira Filho; a Embrapa pelo financiamento do projeto de pesquisa; a Dra. Márcia Cristina da Silva e Suzana Satomi Kuchiishi (Cedisa) por suporte intelectual; e Altair Althaus, Dejalmo A. da Silva, Franciele Ianiski, Franciana A. Volpato (Embrapa Suínos e Aves), e Kelen Ascoli (Cedisa) por valioso suporte técnico; a Dra. Valéria Dutra (UFMT), Dr. Luciano Nakazato (UFMT), Dr. Roberto Guedes (UFMG), Msc. Eliana Silva Paladino (UFMG) e ao Médico Veterinário Lucas Fernando do Santos (MICROVET<sup>®</sup>) pelo suporte laboratorial e de amostras no estado do Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás. Aos médicos veterinários que auxiliaram nas coletas de amostras, às médicas veterinárias Juliana Bassani, Juliana Lazarotto, Lídia Sbaraine Arend, Karine Ludwing Takeuti e ao médico veterinário Caio C. M. Zaccaro pelo suporte técnico na reprodução experimental.

## Referência Bibliográfica

Anderson LC, Rush HG, Glorioso JC: **Strain differences in the susceptibility and resistance of *Pasteurella multocida* to phagocytosis and killing by rabbit polymorphonuclear neutrophils** *Am J Vet Res* 1984, 45:1193-1198.

Bethe A, Wieler LH, Selbitz H, Ewers, C: **Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine** *Vet Microbiol* 2009, **139**:97-105.

Biberstein EL: **Our understanding of the *Pasteurellaceae*** *Can J Vet Res* 1990: **54**, S78-S82.

Blackall PJ, Fegan N, Pahoff JL, Storie, GJ, McIntosh GB, Cameron RD, O'Boyle D, Frost AJ, Bara MR, Marr G, Holder J: **The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis** *Vet Microbiol* 2000: **72**:111-120.

Cameron RD, O'Boyle D, Frost AJ, Gordon AN, Fegan N: **An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp *gallicida* in large pig herd** *Aust Vet J* 1996, **73**:27-29.

Cappuccio J, Leotta GA, Vigo G, Moredo F, Wolcott MJ, Perfumo, CJ: **Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs with bronco and pleuropneumonia** In: International Pig Veterinary Society Congress, 18<sup>th</sup>, 2004, Hamburg/Germany. Proceedings 2004, **1**:205.

Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Franzão, N, de Lencastre H, Almeida JS: **Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis** *J Clin Microbiol* 2005, 3:5483–5490.

Choi YK, Goyal SM, Joo HS: **Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs** *Can Vet J* 2003, **44**: 735-737.

Davies RL, MacCorquodale R, Baillie S, Caffrey B: **Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis** *J Med Microbiol* 2003, **52**: 59-67.

DeBey M, Ross RF: **Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures** *Infect Immun* 1994, **62**:5312-5318.

Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kießling S, Filter M, Wieler LH: **Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status** *Vet Microbiol* 2006, **114**: 304-317.

Fablet C, Marois-Créhan C, Simon G, Grasland B, Jestin A, Kobisch M, Madec F, Rose N: **Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study.** *Vet Microbiol* 2012, **157**: 152–163.

Falk K, Høie S, Lium BM: **An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology.** *Acta Vet Scand* 1991, **32**:67-77.

Fernandez de Henestrosa AR, Badiola I, Saco M, Perez DE, Rozas AM, Campoy S, Barbe J: **Importance of the gale gene on the virulence of *Pasteurella multocida*** *FEMS Microbiol Lett* 1997, **154**: 311–316.

Frey J: **The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*** *Vet Microbiol* 2011, **153**: 51-58.

Gauger PC, Vincent AL, Loving CL, Henningson JN, Lager KM, Janke BH, Kehrli ME Jr, Roth JA: **Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus** *Vet Pathol* 2012, **49**:900-912.

Gottschalk M: **Actinobacillosis** In: Zimmerman, JJ, Karriker, LA, Ramirez, A, Schwartz, KJ, Stevenson, G. W (EdS), *Diseases of swine* 10<sup>th</sup> ed, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2012:653-669.

Hansen LM, Hirsh DC: **Serum resistance is correlated with encapsulation of avian strains of *Pasteurella multocida*** *Vet Microbiol* 1989, **21**:177–184.

Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL: **An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark** *J Comp Pathol* 2010, **143**: 120-131.

Harmon BG, Glisson JR, Latimer KS, Steffens WL, Nunnally JC: **Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils** *Am J Vet Res* 1991, **52**:1507 – 1511.

Høie S, Falk K, Lium B: **M An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions** *Acta Vet Scand* 1991, **32**: 395-402.

Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, Leengoed LV, Wisselink H, Raymakers R, Cruijssen T, Peet-Schwering CV.D, Nielen M, Nes AV: **Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis** *Res Vet Sci* 2010, **88**: 11-15.

Jordan D, Hoffman L; Thacker E: ***Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex (PRDC)**. *AASV*. 2006:149-152.

Kich JD, Mores N, Triques NJ, Nogueira MG, Locatelli C, Klein CS, Felicio RP: ***Pasteurella multocida* Tipo A atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? (Could *Pasteurella multocida* Type A act as the primary agent in cases of pneumonic pigs?)**. Comunicado Técnico N 469, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, 2007:7 (in Portuguese). ([wwWcnpsAembrapAbr/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_x8g42b6i.pdf](http://www.WcnpsAembrapAbr/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_x8g42b6i.pdf)).

López A: Respiratory System In: McGavin, MD; Zachary, JF.. **Pathologic Basis of Veterinary Disease** 4. ed St. Louis: Mosby 2007:463-558.

Mackie JT, Barton M, Kettlewell J: ***Pasteurella multocida* septicaemia in pigs** *Aust Vet J* 1992, **69**:227-228.

Marois C, Fablet C, Gaillot O, Morvan H, Madec F, Kobisch M: **Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*** *J Appl Microbiol* 2009, 107: 1830-1836.

Moreno AM, Baccaro MR, Ferreira AJP, De Castro AFP: **Use of Single-Enzyme Amplified Fragment Length Polymorphism for Typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* Isolates from Pigs** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1743–1746.

Morrison RB, Pijoan C, Hilley HD, Rapp V: **Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine** *Can J Comp Med* 1985, **49**:129-137.

Ono M, Okada M, Namimatsu T, Fujii S, Mukai T, Sakano T: **Septicaemia and arthritis in pigs experimentally infected with *Pasteurella multocida* capsular serotype A** *J Comp Pathol* 2003, 129:251-258.

Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG: **Polymicrobial respiratory disease in pigs** *Anim Health Res Rev* 2011, 12:133–148.

Piffer IA, Brito JRF.: **Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos.** Comunicado Técnico N 23, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, 1991:12.

Pijoan C, Fuentes M: **Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine** *J Am Vet Med Assoc* 1987, **191**:823-826.

Pijoan C, Morrison RB, Hilley H D: **Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter** *J Clin Microbiol* 1983, **17**:1074–1076

Pors SE, Hansen MS, Bisgaard M, Jensen HE: **Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia** *Vet Microbiol* 2011, **150**: 160-166.

Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR, Brogden KA: **Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages** *Avian Dis* 1996, **40**:887- 893.

Quinn P.J, Markey B K, Leonard F. C, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigen PJ: ***Pasteurella* species, *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi*.** IN:\_\_\_\_*Veterinary Microbiology and Microbial Diseases* 2<sup>a</sup> ed Ames, Iowa, Wiley-Blackwell cap. 27, 2011:300-308.

Ross RF: ***Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia** *Anim Health Res Rev* 2007, **7**: 13-29.

Rubies X, Casal J, Pijoan C: **Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid** *Vet Microbiol* 2002, **84**: 69–78.

Smith IM, Betts AO, Watt RG. Hayward AHS: **Experimental infections with *Pasteurella multocida* (sero-group A) and an adeno- or enterovirus in gnotobiotic piglets** *J Comp Pathol* 1973, **83**:1-12.

Snipes K P, Hirsh DC: **Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys** *Avian Dis* 1986, **30**:500–504.

Thomson JR, Macintyre N, Henderson EA; Meikle CS: **Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome** *Vet Rec* 2001, **149**:412-417.

Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B: **Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system** *J Clin Microbiol* 2001, **39**:924–929.



Truscott WM, Hirsh DC: **Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin** *Infect Immun* 1988, **56**:1538–1544.

Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ: **Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings** *J Vet Diagn Invest* 1995, **7**:476–480.

Yamaguti M, Muller EE, Piffer AI, Kich JD, Klein CS, Kuchiishi SS: **Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems** *Braz J Microbiol* 2008, **39**:471-47.

Zhao G, Pijoan C, Murtaugh MP, Molitor TW: **Use of restriction endonuclease analysis and ribotyping to study epidemiology of *Pasteurella multocida* in closed swine herds** *Infect Immun* 1992, **60**:1401–1405.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Doença respiratória é um dos mais importantes desafios sanitários em países produtores de suínos. No Brasil existe uma incidência significativa de pneumonias em suínos na fase de terminação e, muitas vezes, a constatação do problema ocorre apenas no frigorífico. Isto acarreta em significativa perda econômica na cadeia produtiva, além de afetar negativamente o bem-estar animal. Atualmente, em se tratando de doenças respiratórias, utiliza-se o termo Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS), devido ao envolvimento de mais de um agente etiológico associado aos fatores de risco não infecciosos. Dentre os agentes infecciosos, *Pasteurella multocida* A é um dos principais micro-organismos envolvidos no CDRS e é historicamente conhecida como um agente secundário. No entanto, no Brasil, ocorrências constantes de surtos de doenças respiratórias graves associadas à *P. multocida* em suínos de terminação são relatadas por Médicos Veterinários que atuam no campo. Além disso, alguns estudos já demonstram seu papel primário na doença.

O presente estudo demonstrou a atuação primária de algumas cepas de *P. multocida* em pneumonias, pleurites e septicemias em suínos inoculados com cultura pura da bactéria, além de demonstrar a presença de cepas com diferentes perfis de patogenicidade e genético. No primeiro estudo, foi demonstrado que inóculos puros de *P. multocida* A (cepa 11246) na concentração de  $10^5 - 10^8$  UFC/ml são capazes de produzir sinais clínicos, caracterizados por dispneia e hipertermia, e lesões severas de broncopneumonia supurativa associada ou não com pleuropneumonia necrossupurativa, pericardite e septicemia em suínos. Possivelmente, a reprodução da doença foi possível pelas características patogênicas da cepa utilizada de *P. multocida* A. Assim, cria-se a hipótese da existência de diferentes perfis patogênicos de *P. multocida* circulantes entre os rebanhos brasileiros e de outros países, justificando o insucesso de diversos trabalhos com o mesmo objetivo. O segundo trabalho demonstrou a existência de cepas de alta e baixa patogenicidade, além de cepas apatogênicas. Isso pode ser justificado pela diferença genética entre os isolados, demonstrada no teste de PFGE que distinguiu as cepas patogênicas das não patogênicas. Essa diferença genética pode estar relacionada a funcionalidade gênica e, com isso, interfere na patogenicidade bacteriana.

Com esses resultados, trabalhos futuros serão direcionados para explicar as diferenças nos achados clínico-patológicos através de testes de sequenciamento genômico e de funcionalidade gênica. Além do estudo de patogenicidade de *P. multocida* desenvolvido, a linha de pesquisa trabalha em caracterizar os quadros clínicos e patológicos de doenças respiratórias nos estados brasileiros produtores de suínos e os isolados de *P. multocida* através de testes bioquímicos, moleculares e de concentração mínima inibitória. Este estudo foi desenvolvido na Embrapa suínos e aves em parceria com instituições de ensino e pesquisa e de laboratórios comerciais de diagnóstico.

Os resultados destes estudos serão úteis para a cadeia produtiva no sentido de avaliar com mais atenção à necessidade de, em determinadas situações, utilizar ferramentas de controles específicos para a pasteurelose, além de comprovarem a necessidade de diagnóstico diferencial desta doença nas doenças respiratórias com lesões sugestivas de Doença de Glasser e Pleuropneumonia suína.