

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

“CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*  
ISOLADAS DE LESÕES PNEUMÔNICAS ASSOCIADAS OU NÃO COM  
CIRCOVIROSE EM SUÍNOS.”

**Autor:** Tiago da Silva Heres

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

**Orientador:** Prof. Dr. David Emilio  
Santos Neves de Barcellos

PORTO ALEGRE

2009

H542c Heres, Tiago da Silva

Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos./ Tiago da Silva Heres. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

63f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. David Emilio Santos Neves de Barcellos, Orient.

1. *Pasteurella multocida*: suínos 2. Pneumonia enzoótica suína  
3. Circovirose suína I. Barcellos, David Emilio Santos Neves de, Orient.  
II. Título.

CDD 619.4

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

**Tiago da Silva Heres**

“CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*  
ISOLADAS DE LESÕES PNEUMÔNICAS ASSOCIADAS OU NÃO COM  
CIRCOVIROSE EM SUÍNOS.”

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira  
Membro da Comissão

Dedico este trabalho a meus avós  
Albino e Leci (*in memoriam*), por todo  
amor, carinho e sabedoria transmitidos.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer meus familiares pelo apoio dado de forma incondicional. Se não fosse por eles, essa etapa da minha vida teria sido muito mais tortuosa.

Ao meu amigo Albino Magalhães Neto, pelos conselhos e reflexões.

Aos professores David, Ivo, Mari e Fernando, pela convivência tida nestes dois anos de mestrado.

Ao Setor de Suínos, em especial para Brenda, Bruno, Lídia, Jamil, Luís, Lisiane, José Roberto e Paola, pela ajuda.

A seu Santinho, pela ajuda oferecida.

Aos amigos do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Nice, Mari e Valesca. Em especial gostaria de agradecer a Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria Borowski pelo apoio, amizade e “suporte técnico”.

Gostaria também de agradecer a todos que, mesmo da forma mais ínfima, ajudaram nessa jornada.

## RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLADAS DE LESÕES PNEUMÔNICAS ASSOCIADAS OU NÃO COM CIRCOVIROSE EM SUÍNOS.

Autor: Tiago da Silva Heres

Orientador: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

A *Pasteurella multocida* é o agente causador da pasteurelose pulmonar dos suínos, sendo comum a ocorrência dessa infecção associada com o *Mycoplasma hyopneumoniae* no curso da pneumonia enzoótica. O agente é encontrado em pulmões de várias espécies animais e no homem. A infecção de suínos com o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) causa uma forma de infecção sistêmica com profundos efeitos no sistema linfóide, causando prejuízos aos processos normais de defesa e facilitando a instalação de infecções secundárias, incluindo a pneumonia enzoótica complicada pela *Pasteurella multocida*. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar amostras de *P. multocida* obtidas de suínos com sinais clínicos compatíveis com os da circovirose e de animais de frigorífico quanto ao seu perfil bioquímico, capsular e sensibilidade a antimicrobianos. Foram utilizados 453 materiais (pulmões e suabes das lesões pulmonares), resultando em 115 isolados bacterianos de 79 pulmões. Paralelamente, procurou-se avaliar a eficiência do isolamento da bactéria a partir de dois sítios de amostragem no pulmão: do exsudato bronquial e da superfície de corte pulmonar. Numa amostragem dos casos, procurou-se estabelecer a relação entre a infecção com PCV2 e as lesões pulmonares induzidas pela *P. multocida*. Numa análise do grau de pneumonia foram classificadas 38 lesões como leves, 19 como médias e 15 graves. Na análise bacteriológica, todas as amostras foram positivas para o teste da catalase e oxidase e negativas para o citrato e H<sub>2</sub>S, e 11,3% foram negativas ao teste do indol. Utilizando-se os substratos sorbitol, manitol, trealose, maltose e arabinose foram observados seis perfis distintos. O tipo capsular A esteve presente em 93,91% das amostras e o tipo D em 6,09%. Nenhuma das amostras possuía o gene codificador da toxina dermonecrótica (*toxA*) e a resistência antimicrobiana foi baixa e a oxitetraciclina o princípio ativo com maior resistência 15,65%.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, pneumonia, circovirose, caracterização

## **ABSTRACT**

*Author: Tiago da Silva Heres*

*Advisor: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos*

*Pasteurella multocida* is the etiologic agent of swine respiratory pasteurellosis and the infection occurs specially associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* in the course of enzootic pneumonia. The agent can be isolated from the lung of several animal species and man. Infection of pigs with porcine circovirus (PCV2) causes a systemic infection with deep effects on the lymphoid system (porcine multisystemic wasting syndrome, PMWS), resulting in impairment of the normal defense processes and facilitating secondary infections, including enzootic pneumonia complicated with *Pasteurella multocida*. The objective of the present work was to isolate and characterize strains of *P. multocida* obtained from pigs with clinical signs compatible with PMWS and from slaughter pigs, considering biochemical profile, capsular typing and antibiotic sensitivity testing. A total of 453 materials (lungs and swabs from lung lesions) were used, resulting in 115 bacterial isolates from 79 lungs. At the same time, the efficiency of the isolation of the bacteria from two different sites in the lung was assessed: bronchial exudate and the cut surface of the lung. In a sample of the cases it was tried to establish the relationship between PCV2 infection and lung lesions induced by *P. multocida*. Analyzing degrees of pneumonia, 38 lesions were classified as mild, 19 as intermediate and 15 as severe. In the bacteriological analysis, all strains were positive for catalase and oxidase, and negative for citrate and H<sub>2</sub>S, and 11.3 were negative in the indole test. Using sugar fermentation (sorbitol, manitol, trealose, maltose and arabinose) six different profiles were established. Capsular type A was diagnosed in 93.91% of the samples and type D in 6.09%. All strains were negative for the gene codifying dermonecrotic toxin (*toxA*). Antimicrobial resistance was low, and tetracycline was the product showing higher resistance (15.65%).

Key-words: *Pasteurella multocida*, pneumonia, circovirus infection, characterization

**LISTA DE TABELAS****Revisão bibliográfica**

TABELA 1-	Resistência antimicrobiana observada em cepas de <i>P. multocida</i> isoladas de suínos no mundo.	22
TABELA 2-	Resistência antimicrobiana observada em cepas de <i>P. multocida</i> isoladas de suínos no Brasil.	23

**Artigo**

TABELA 1-	Grau de consolidação pulmonar encontrado em lobos pulmonares.	45
TABELA 2-	Análise histopatológica de 89 amostras de tecidos pulmonares provenientes de leitões necropsiados e de frigorífico.	46
TABELA 3-	Imuno-histoquímica para PCV2 e <i>M. hyopneumoniae</i> em animais positivos para <i>Pasteurella multocida</i> .	46
TABELA 4-	Perfis de fermentação de substratos apresentados por 115 amostras de <i>P. multocida</i> .	46
TABELA 5-	Distribuição dos tipos capsulares conforme a forma de coleta do material.	46
TABELA 6-	Resistência antimicrobiana apresentada e interações entre os princípios ativos.	47

**LISTA DE FIGURAS**

Figuras 1 e 2	Frente e verso de pulmão representativo para classificação em grau leve de pneumonia.	47
Figuras 3 e 4	Frente e verso de pulmão representativo para classificação em grau médio de pneumonia.	47
Figuras 5 e 6	Frente e verso de pulmão representativo para classificação em grau grave de pneumonia.	48

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\mu\text{m}$	Micrômetros
DNA	ácido desoxirribonucléico
g/mL	Gramas por mililitro
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
Kb	Quilo bases
KDa	Quilo daltons
LPS	Lipopolissacarideo de membrana
ORF	Fases abertas de leitura
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV1	Circovírus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PRRS	Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
SMDS	Síndrome multissistêmica do definhamento suíno
<i>toxA</i>	Gene codificador da toxina dermonecrótica

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 <i>Pasteurella multocida</i> .....	14
2.1.1 Importância e Epidemiologia.....	14
2.1.2 Bacteriologia.....	15
2.1.3 Classificação Antigênica e Sorológica.....	16
2.1.4 Toxinas.....	17
2.1.5 Patogenia.....	18
2.1.6 Sinais Clínicos e Lesões.....	19
2.1.7 Suscetibilidade Antimicrobiana.....	20
2.2 Circovírus Suíno Tipo 2.....	23
2.2.1 Etiologia.....	23
2.2.2 Importância econômica.....	25
2.2.3 Epidemiologia.....	25
2.2.4 Aspectos Genéticos.....	26
2.2.5 Isolamento Viral.....	26
2.2.6 Patogenia.....	27
2.2.7 Sinais Clínicos.....	27
2.2.8 Diagnóstico.....	28
2.2.9 PCV2 associado ao Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos.....	29
3. ARTIGO.....	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
5. ANEXOS.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A *Pasteurella multocida* é o agente causador da pasteurelose pulmonar dos suínos, sendo comum a ocorrência dessa infecção associada com o *Mycoplasma hyopneumoniae* no curso da pneumonia enzoótica. Além dessa infecção bacteriana, a instalação do agente pode ser predisposta por infecções virais como a circovirose suína (KIM et al., 2003).

As pneumonias em suínos constituem doenças de alto custo (PIJOAN, 2006) e sob o ponto de vista econômico, as doenças respiratórias representam um dos principais problemas às granjas de suínos causando mortalidade, atraso no desenvolvimento, falta de uniformidade dos lotes, condenação de carcaças e gasto com medicamentos (BOROWSKI, 2006).

A *P. multocida* é um coco-bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, oxidase positivo, imóvel e indol positivo. Não cresce em ágar Mac Conkey e não requer os fatores X e V para crescimento (PIJOAN, 2006). O agente é incapaz de agir como patógeno primário, necessitando interagir com outros microorganismos para produzir pneumonia (PIJOAN, 2006). Entre as interações reconhecidas, a principal é com o *Mycoplasma hyopneumoniae*, mas recentemente foi demonstrado um aumento da infecção com a bactéria em casos de infecções com o PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2007).

Segundo Borowski (2001), muitos autores têm dividido as amostras de *P. multocida* com base nas características bioquímicas, classificando-as em três subespécies: *P. multocida* subsp. *gallicida*, *P. multocida* subsp. *multocida* e *P. multocida* subsp. *septica*, sendo estas diferenciadas através da observação da fermentação dos substratos sorbitol e dulcitol (MUTTERS et al., 1985). De casos de pneumonia em suínos, a *P. multocida* subsp. *multocida* tem sido a mais isolada (BLACKALL et al. 1997).

A maioria dos isolados de *P. multocida* possui uma cápsula de polissacarídeo, similar às encontradas em outras espécies bacterianas (BOYCE et al., 2000) e com base na análise desses, existem cinco sorotipos capsulares, A, B, D, E e F. Entre esses, os sorotipos A, B, D e F já foram detectados em suínos (BOROWSKI et al., 2007). O sorotipo A tem sido o mais comumente isolado em quadros de pneumonia (PIJOAN, 2006). Entretanto, nos últimos anos, tem aumentado o registro de isolamentos de *P. multocida* tipo D associados com processos pneumônicos (BOROWSKI et al., 2007). Num levantamento realizado por essa autora no Brasil em

2001, amostras do tipo D foram detectadas em 4,17% dos casos. No mesmo país, em 2006, foram estudadas 77 amostras isoladas de pulmões de suínos desviados pelo Serviço de Inspeção Federal e 41 (53,2%) das amostras foram classificadas como pertencentes ao tipo capsular D (MORES, 2006). Nos Estados Unidos, em 1996 os isolamentos do tipo D eram menores do que 2% e em 2003 já ultrapassavam 33% (JORDAN et al., 2006).

Dois tipos de toxinas são produzidos pela *P. multocida*: endotoxina e toxina protéica (BOROWSKI, 2001). A exotoxina é chamada toxina dermonecrótica e é produzida principalmente pelo sorotipo capsular D. É codificada pelo gene *toxA* (LICHTENSTEIGER et al., 1996) e a ação patogênica está mais relacionada com a rinite atrófica progressiva (DAVIES et al., 2003). Alguns autores registraram o isolamento de amostras toxigênicas de pulmões de suínos (PIJOAN et al., 1984), entretanto, essa característica não parece ser importante na reprodução experimental da pneumonia por *P. multocida* (BAEKBO, 1988). Amostras toxigênicas e não toxigênicas de *P. multocida* não diferem nas reações bioquímicas ou na morfologia colonial (LICHTENSTEIGER et al., 1996).

Estudos voltados para susceptibilidade antimicrobiana da *P. multocida* são escassos (HEIM et al. 2005), tais dados são mais encontrados em resumos apresentados em congressos. Existe interesse no estudo da evolução da resistência aos antimicrobianos pela forma intensiva como esses produtos vêm sendo usados na criação industrial de suínos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Pasteurella multocida*

#### 2.1.1 Importância e Epidemiologia

A *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) tem sido encontrada em pulmões de suínos de diversos países, em vários tipos de clima e condições de criação (BOROWSKI et al., 2007). Ocorre frequentemente como estágio final da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* (pneumonia enzoótica) ou da Síndrome Complexo Respiratório Suína (SCRS) (PIJOAN, 2006), mas pasteurelose sistêmica não é frequentemente diagnosticada em suínos (VERA LIZARAZO et al., 2008). No Brasil, é cada vez maior o número de isolamentos de cepas dessa bactéria a partir de pulmões de suínos com pneumonia e pleurite (BOROWSKI, 2006). Métodos convencionais de isolamento e identificação da *P. multocida* são exaustivos e consomem tempo. Nos últimos anos, métodos genéticos para identificação bacteriana provaram ser benéficos para ultrapassar algumas limitações da forma tradicional de identificação fenotípica (KALOREY et al., 2007).

A pneumonia em suínos tem mostrado ser de alto custo (PIJOAN, 2006). Sob o ponto de vista econômico, as doenças respiratórias representam um dos principais problemas às granjas de suínos (BOROWSKI, 2006), estando entre os mais frequentes e custosos problemas a produção de suínos (HALLOY et al, 2005). Os prejuízos são decorrentes não somente da mortalidade de animais, mas repercutem também no atraso no desenvolvimento dos animais, falta de uniformidade dos lotes, condenação de carcaças no frigorífico e gasto com medicamentos (BOROWSKI, 2006). Segundo Zhao et al., (1992), a infecção por *P. multocida* é a forma de pneumonia que causa maiores prejuízos econômicos à indústria suína.

Além da espécie suína, a *P. multocida* pode ser agente primário ou secundário de pneumonias em bovinos e, ocasionalmente, em ovinos (GILMOUR, 1978). A infecção raramente afeta seres humanos (CHARALAMPOPOULOS et al., 2006). Além de pneumonias, a *P. multocida* também pode atuar como agente primário ou secundário de diversas doenças, causando septicemia hemorrágica em bovinos e bubalinos, cólera aviária (FROST & ADLER, 2000), rinite atrófica progressiva em suínos (HARPER et al., 2006) e síndrome dermatite e nefropatia dos suínos (LAINSON et al., 2002). A infecção em humanos geralmente é associada com alguma

forma de contato com animais, mais comumente com arranhaduras e mordedura de cães e gatos (GERARDO et al., 2001). Segundo Ross (2007), alguns autores demonstraram experimentalmente que a pneumonia causada pela *P. multocida* pode estar associada à infecção com *Ascaris suum*. Também foi demonstrado que micotoxinas podem predispor à pneumonia por *P. multocida* (HALLOY et al., 2005).

### 2.1.2 Bacteriologia

A *P. multocida* é um cocobacilo Gram-negativo, medindo 0,5-1 x 1-2 µm (PIJOAN, 2006) e seu tempo de geração está ao redor de 15-20 minutos (FROST & ADLER, 2000). O organismo é anaeróbio facultativo, oxidase positivo, imóvel, indol positivo (PIJOAN, 2006), embora amostras não produtoras de indol já tenham sido encontradas (VERA LIZARAZO et al., 2008), urease negativo e não hemolítico. Não cresce em ágar Mac Conkey e não requer os fatores X e V para seu crescimento (PIJOAN, 2006). Em cultivos em meios enriquecidos com sangue ou soro, em aerobiose por 18 a 24 horas a 37°, geram colônias de um a três milímetros de diâmetro, com uma ou ambas as formas principais, isto é, mucóides e lisas. Menos frequentemente podem ser observadas formas rugosas. As colônias mucóides são compostas por células com cápsula, sendo circulares e convexas, úmidas e viscosas. As colônias lisas são compostas por bactérias capsuladas e não capsuladas e são pequenas, circulares e convexas (BOROWSKI, 2001). Pertence à microbiota nasal de suínos e é extremamente difícil de ser erradicada (PIJOAN, 2006). Braga et al. (2005) sugerem que o cão possa ser um reservatório natural do agente. Chen et al. (2002) indicam que *P. multocida* possa fazer parte da microbiota do trato respiratório de humanos. O agente tem sido encontrado em estudantes de veterinária saudáveis e tratadores de animais sem doença respiratória. O agente é incapaz de agir como patógeno primário, necessitando interagir com outros microorganismos para produzir pneumonia (PIJOAN, 2006). Dados recentes de Kich et al. (2007) sugerem que *P. multocida* pode estar envolvida como agente primário em quadros de pneumonia. Ross (2007) registrou que vários autores reproduziram experimentalmente lesões de pneumonia ao utilizarem uma combinação de *P. multocida* e outros patógenos pulmonares, mas essa interação não foi observada com o vírus da PRRS.

A *P. multocida* foi classificada em três subespécies com base na hibridização do DNA, chamadas *P. multocida* subespécie *gallicida*, *P. multocida* subespécie *multocida* e *P. multocida* subespécie *septica* (MUTTERS et al., 1985). Segundo Borowski (2001),

muitos autores têm separado amostras de *P. multocida* com base nas características bioquímicas. Esses subgrupos têm sido baseados principalmente nas reações observadas com a produção de ácido a partir de certas pentoses (como xilose e arabinose), dissacarídeos (como maltose e trealose) e álcoois polihídricos (como sorbitol, manitol e dulcitol). Segundo Davies (2004) as três subespécies podem ser diferenciadas entre si observando-se a fermentação do sorbitol e dulcitol, onde *P. multocida* subespécie *gallicida* fermenta ambos, *P. multocida* subespécie *multocida* fermenta apenas sorbitol e *P. multocida* subespécie *septica* não fermenta nenhum dos dois. Pelo fato de que a *P. multocida* está presente em diversos processos infecciosos, essa tipificação se faz importante para conhecer qual subespécie está mais relacionada com processos pneumônicos, para que se possam ser implementadas medidas de controle apropriadas (BOROWSKI, 2001). Dados recentes indicam que as subespécies de *P. multocida* não representam grupos genotípicos distintos (DAVIES, 2004).

### **2.1.3 Classificação Antigênica e Sorológica**

A maioria dos isolados de *P. multocida* possui cápsula de polissacarídeo similar às encontradas em muitas espécies bacterianas (BOYCE et al., 2000). Existem cinco sorotipos capsulares, A, B, D, E e F, e os sorotipos A, B, D e F já foram detectados em suínos. O sorogrupo B causa uma doença severa, mas é de ocorrência rara, com registros apenas no sudeste da Ásia, China e Índia (BOROWSKI et al., 2007), sendo o sorotipo A o mais comumente isolado em quadros de pneumonia, mas o sorogrupo D também é encontrado (PIJOAN, 2006). Nos últimos anos tem sido descrito um aumento no número de isolados de *P. multocida* tipo D associado com processos pneumônicos (BOROWSKI et al., 2007), nos Estados Unidos em 1996 eram menores do que 2% e em 2003 já ultrapassavam 33% (JORDAN et al., 2006). Em 2006, Mores, demonstrou que o mesmo está ocorrendo no Brasil ao isolar 77 amostras de *P. multocida* obteve 41 (53,2%) amostras pertencentes ao tipo capsular D.

A composição capsular tem sido investigada apenas nos sorogrupos A, B, D e F (BOYCE et al., 2000). O material capsular de todas as amostras do sorogrupo A possui ácido hialurônico (PANDIT & SMITH, 1993). A natureza da cápsula do sorotipo D ainda não está completamente determinada (BOROWSKI, 2001), mas quando separada por gradiente de cloreto de sódio através de cromatografia, migra de forma idêntica ao sorogrupo A, mas não é susceptível ao teste da hialuronidase (BOYCE et al., 2000). É, entretanto, susceptível a heparinase III e condroitinase AC (RIMLER, 1994). O material

capsular do sorogrupo F é susceptível à condroitinase AC, mas não à hialuronidase ou heparinase III (RIMLER, 1994). Com a utilização exclusiva de métodos para identificar não sorologicamente os sorogrupos A e D, o sorogrupo F provavelmente seria classificado como não tipificável ou como pertencente ao sorogrupo D (RIMLER & RHOADES, 1989).

O antígeno capsular do sorogrupo B mostrou conter frutose, manose, glicose e glicosamida (KNOX & BAIN, 1960 apud BOYCE et al., 2000). Carter e Rundell (1975) desenvolveram um teste simples em que cepas do tipo A podem ser reconhecidas pela despolimerização da cápsula após crescimento na proximidade de uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de hialuronidase (satelitismo negativo). Para o tipo D, a base do teste para reconhecimento presuntivo do sorogrupo é a reação flocular característica com o uso da acriflavina (CARTER & SUBRANTO, 1973). Entretanto, os autores demonstraram que alguns isolamentos frescos de *P. multocida* do tipo F podiam reagir de forma similar à reação com a acriflavina.

A cápsula de polissacarídeo tem sido proposta como podendo servir a importantes funções como proteger a bactéria da desidratação, mas não há trabalhos relatando a resistência da *P. multocida* à dessecação (BOYCE et al., 2000). De acordo com Pijoan (2006), a cápsula mostra-se um importante fator de virulência, especialmente no sorotipo A, por auxiliar o patógeno a evitar a fagocitose por macrófagos alveolares, pelo menos in vitro.

Além da classificação baseada no componente capsular, a *P. multocida* pode ser classificada tendo como base os antígenos somáticos (BOROWSKI, 2001), possuindo 16 sorotipos somáticos, sendo os sorotipos 3 e 5 os mais comumente detectados em suínos e os tipos A:3, A:5, D:5 e D:3 os mais prevalentes nesta ordem (PIJOAN, 2006). Portanto, a classificação sorológica da *P. multocida* pode ser realizada com base nos antígenos capsulares e somáticos, adotando-se a seguinte nomenclatura: letra maiúscula para os antígenos capsulares e número arábico para os antígenos somáticos (BOROWSKI, 2001). Essa classificação é de difícil realização por não existirem atualmente no mundo laboratórios de referência realizando esse procedimento de forma sistemática (BOROWSKI, 2008).

#### **2.1.4 Toxinas**

Dois tipos de toxinas são produzidos pela *P. multocida*, endotoxina e toxina protéica (BOROWSKI, 2001). A atividade da endotoxina da *P. multocida* deve-se ao

LPS, que é um componente estrutural da membrana externa da célula encontrada em todas as amostras (BOROWSKI, 2001). A toxina dermonecrótica, expressada principalmente pelo sorotipo capsular D é a única a ter sido identificada (RIMLER & RHOADES, 1989). Ela possui 145 KDa e é codificada pelo gene *toxA* (LICHTENSTEIGER et al., 1996). A toxina purificada é imunogênica e anticorpos produzidos contra ela protegem contra a doença (BOROWSKI, 2001). O gene *toxA*, está mais presente em amostras de *P. multocida* do tipo D, mais relacionadas com rinite atrófica progressiva (DAVIES et al., 2003), mas também é encontrado em amostras do tipo A (NAGAI et al., 1994). A amplificação de um fragmento de DNA de amostras pertencentes ao tipo A e D indicaram que a região do gene *toxA* é bastante similar entre os dois perfis capsulares (NAGAI et al., 1994).

Alguns autores registraram o isolamento de amostras toxigênicas de pulmões de suínos (PIJOAN et al., 1984), entretanto, a toxigenicidade não parece ser importante na reprodução experimental de pneumonia por *P. multocida* (BAEKBO, 1988). A habilidade de amostras de *P. multocida* produzirem toxina é um fator determinante à patogenia da rinite atrófica progressiva. Apesar disso, algumas amostras toxigênicas do sorotipo capsular A tem sido isoladas em suínos com rinite atrófica progressiva (PIJOAN et al., 1984). Amostras toxigênicas e não toxigênicas de *P. multocida* não diferem nas reações bioquímicas ou na morfologia colonial (LICHTENSTEIGER et al., 1996).

### **2.1.5 Patogenia**

Provavelmente o contato focinho-focinho seja a rota mais comum de infecção pela *P. multocida* e, embora a transmissão por aerossóis também tenha sido postulada, é pouco provável que seja importante (PIJOAN, 2006). Existem informações sobre os principais fatores envolvidos no relacionamento entre *P. multocida* e o hospedeiro. Esses incluem a secreção de componentes (toxinas) em adição com componentes de superfície (cápsula, LPS ou outras proteínas de membrana) (SMITH, 2000).

A colonização da superfície do muco por *P. multocida* parece ser um fator importante na patogenia da infecção pelo agente (PIJOAN, 2006). Jacques (1987) demonstrou que o sorotipo A adere principalmente a células epiteliais ciliadas, e Pijoan & Trigo (1989) demonstraram que o sorotipo D adere principalmente a células não ciliadas. Ross (2007) em sua revisão encontrou diversos trabalhos que tentam elucidar os mecanismos de aderência da *P. multocida* ao trato respiratório, chegando à

conclusão de que ainda são necessários maiores estudos para uma melhor compreensão destes mecanismos e sua importância em quadros de pneumonia.

### 2.1.6 Sinais Clínicos e Lesões

Os sinais clínicos variam em severidade, dependendo da amostra de *P. multocida* envolvida e do grau de imunidade do animal (PIJOAN, 2006). São descritas três formas clínicas: aguda, subaguda e crônica.

A forma aguda de pneumonia está mais associada com amostras do sorotipo B e a mortalidade pode ser alta (5 a 40%), mas este tipo de infecção é rara em suínos. A forma subaguda está associada com amostras que produzem pleurite, sendo observada tosse e respiração abdominal em animais na fase de crescimento e terminação. Clinicamente a doença pode ser confundida com a pleuropneumonia causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porém na pasteurelose geralmente não ocorre morte súbita. A forma crônica é a mais comum e se caracteriza por tosse ocasional de severidade variável, comumente entre 10 a 16 semanas de idade. Os sinais são indistinguíveis daqueles causados pela infecção simples pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* e a *P. multocida* representa uma continuação ou exacerbação da micoplasmose primária (BOROWSKI et al., 2007).

As lesões ocorrem na cavidade torácica e se caracterizam por consolidação de áreas do pulmão. A porção afetada apresenta coloração de vermelha a acinzentada. Podem complicar com pleurite e abscessos, com aderência da pleura a parede torácica. A pleurite geralmente é seca, o que pode auxiliar na diferenciação da pleurite causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, onde costuma ocorrer infiltração com fibrina e a lesão de pleurite parietal é mais severa (BOROWSKI et al., 2007).

As lesões microscópicas são similares às presentes na maioria das pneumonias bacterianas com broncopneumonia exsudativa, presença de neutrófilos no exsudato mucopurulento nos brônquios e alvéolos. Também tem sido relatada a presença de nefrite intersticial associada à broncopneumonia (BOROWSKI et al., 2007).

Sinais das lesões da infecção por *P. multocida* não são patognomônicos e não podem ser usados como único critério para o diagnóstico definitivo da doença. O histórico do foco, lesões presentes na histopatologia e o isolamento do agente deveriam ser usados para confirmar o diagnóstico presuntivo. Testes sorológicos não têm provado eficiência no diagnóstico da pasteurelose, não sendo indicados para a detecção rotineira de *P. multocida* (PIJOAN, 2006).

### 2.1.7 Suscetibilidade Antimicrobiana

Estudos voltados para medir a susceptibilidade antimicrobiana da *P. multocida* são escassos (HEIM et al. 2005), tais dados são mais encontrados em resumos apresentados em congressos. A terapia antimicrobiana é o método mais eficaz para o tratamento da pasteurelose animal e uma grande variedade de produtos antimicrobianos estão disponíveis para uso (YOSHIMURA et al., 2001).

A resistência a drogas resulta de uma resposta adaptativa dos microorganismos que os torna tolerantes a certa quantidade de antimicrobianos, que normalmente inibiria o seu crescimento (TORTORA et al., 2000). Diz-se que uma bactéria é resistente a um determinado antimicrobiano quando o agente é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração que este fármaco atinge no sangue (TAVARES, 1994).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida (KEHRENBURG & SCHWARTZ, 2004). A resistência intrínseca faz parte das características biológicas dos microorganismos e resulta de genes cromossômicos que codificam na célula a existência de estruturas ou mecanismos que impedem o antimicrobiano de agir, ou que codificam a falta do sítio de ação da droga ou que determinam a existência de receptores inadequados para a ligação com uma substância específica (TAVARES, 1994). A resistência adquirida refere-se ao aparecimento de exemplares da espécie bacteriana que não mais sofrem a ação de drogas que são efetivas contra a população original desta bactéria. A resistência adquirida tem também origem genética e decorre de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula que bloqueiam a ação dos antimicrobianos e por elementos extra-cromossômicos denominados plasmídeos (TAVARES, 1994). Na atualidade, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies bacterianas (TAVARES, 1994).

Tendo em vista progressiva resistência bacteriana à rotina de administração de antimicrobianos, a escolha do fármaco torna-se bastante complicada (MARKOWSKA & TARASIUK, 1998), portanto conhecimento sobre o agente etiológico e o uso do antibiograma se faz necessário para auxiliar na escolha do antimicrobiano a ser utilizado (BARCELLOS et al., 2007), juntamente com a observação do ambiente onde os animais se encontram e medidas de manejo são essenciais para o controle de doenças (HOGEDAL et al. 1998). A escolha dos agentes antimicrobianos também deve ser baseada em resistências cruzadas conhecidas que ocorrem nas respectivas bactérias e também selecionar para garantir a maior

sensibilidade possível na detecção da presença de mecanismos de resistência (WALLMANN, 2006).

O desenvolvimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos é um problema multifatorial e que só pode ser resolvido num esforço interdisciplinar. Em princípio, qualquer uso de antimicrobianos aumenta o risco da seleção de resistência. Por esta razão, só com utilização restritiva e prudente dos antimicrobianos existentes pode efetivamente impedir a emergência de problemas de resistência. Cada uso supérfluo, indiscriminado ou incompleto de terapias antimicrobianas pode promover a resistência e aumentar o *pool* de genes com resistência a antimicrobianos em patógenos (WALLMANN, 2006). Recentemente, as indústrias suína e bovina têm enfrentado problemas graves com o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes a vários antibióticos frequentemente utilizados (KIJIMA-TANAKA et al., 2003).

Resistência a antimicrobianos mediada por plasmídeos tem sido associada com a *P. multocida* (RIMLER & RHOADES, 1989), entretanto, FUSSING (1999) não encontrou correlação entre presença de plasmídeos e resistência. Já os estudos desenvolvidos por Kehrenberg & Schwartz (2000, 2001, 2004) demonstraram a presença de plasmídeos portadores de resistência antimicrobiana. Estudando 42 isolados Kehrenberg & Schwartz (2000) encontraram em seis amostras um plasmídeo resistente à tetraciclina, o qual foi denominado pPAT1. Em 2001, os mesmos autores demonstraram que três isolados de *P. multocida* apresentaram o plasmídeo pPMSS1, que possuíam os genes *Sul<sup>R</sup>* e *Str<sup>R</sup>* responsáveis pela resistência aos antimicrobianos sulfametoxazol e estreptomicina. E em 2004, apresentaram um trabalho realizado com a cepa de *P. multocida* GB154, possuidora de um plasmídeo de 11 Kb designado pCCK154. Essa cepa revelou resistência aos antimicrobianos ampicilina, sulfametoxazol e trimetoprima. O plasmídeo pCCK154 possui o gene *dfrA20*, responsável pela resistência a trimetoprima, sendo o primeiro gene com essa resistência detectada em *P. multocida*.

A *P. multocida* geralmente é resistente aos beta-lactâmicos, tetraciclina, tianfenicol e quinolonas (KITADAI et al., 1998). Diversos autores têm estudado a resistência da *P. multocida* frente a antimicrobianos como podemos observar nas Tabelas 1 e 2. Os trabalhos realizados pelo grupo de Champlin têm demonstrado que a *P. multocida* é marcadamente sensível a agentes antimicrobianos hidrofóbicos (ELLISON & CHAMPLIN, 2007).

Tabela 1: Resistência antimicrobiana observada em cepas de *P. multocida* isoladas de suínos no mundo.

<b>Autor</b>	<b>n<sup>1</sup></b>	<b>Resistência encontrada<sup>2</sup></b>
Markowska & Tarasiuk (1998)	12	Lincoespectina
Aitken & Reeve (1998)	46	Oxitetraciclina, trimetoprim/sulfametazol, amoxicilina, tilosina, lincomicina/espectomicina, tiamulina e apramicina.
Yoshimura et al. (2001)	68	Oxitetraciclina e tianfenicol
Shin et al. (2005)	50	Resistência para: enrofloxacina, ceftiofur, tilosina, ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim e ácido nalidíxico Sensibilidade para: florfenicol
Schwarz & Kehrenberg (2006)	392	Não encontraram resistência ao florfenicol
Zizlavsky et al. (2006)	20	Não encontraram resistência a tulatromicina
Prapasarakul et al. (2006)	5	Resistência para amoxicilina e sensibilidade para tiamulina
Usling & Blaha (2006)	38	Resistência para: amoxicilina, apramicina, ceftiofur, eritromicina, lincomicina, penicilina, tetraciclina, tiamulina e tilmicosina Sensibilidade para: enrofloxacina, gentamicina, florfloxacina,
Valle et al. (2006)	480	Não encontraram resistência a marbofloxacina
Zhou et al. (2006)	72	Resistência para: amoxicilina, ceftiofur, cefquinoma, doxiciclina, enrofloxacina, marbofloxacina, oxitetraciclina, tilmicosina e valnemulim Sensibilidade para: florfenicol
Wallmann (2006)	442	Resistência para: ácido nalidíxico, cefalosporina e cefotaxima Sensibilidade para: ceftiofur e enrofloxacina
Wolff (2007)	4201	Clortetraciclina e oxitetraciclina

1: n = número de amostras testadas

2: Amostras consideradas resistentes com base no valor de MIC ou no tamanho dos halos de resistência, com base na interpretação dos autores.

Tabela 2: Resistência antimicrobiana observada em cepas de *P. multocida* isoladas de suínos no Brasil.

<b>Autor</b>	<b>n<sup>1</sup></b>	<b>Resistência encontrada<sup>2</sup></b>
Stepan (1995)	100	Ácido oxolínico, gentamicina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina, danofloxacina, sulfazotrim, canamicina, gentamicina e sulfazotrim
Reis et al. (2000)	30	Florfenicol, josamicina, enrofloxacin, espiramicina, amoxicilina, lincomicina, norfloxacina e tiamulina
Borowski et al. (2002)	22	Amoxicilina, oxitetraciclina, ceftiofur, tilmicosina, enrofloxacin, espectinomicina, canamicina, sulfa-trimetoprima e neomicina
Heim et al. (2005)	25	Tilmicosina
Abilleira et al. (2007)	61	Oxitetraciclina, estreptomicina e sulfa-trimetoprima
Perez Jr. et al. (2007)	20	Clortetraciclina e oxitetraciclina

1: n = número de amostras testadas

2: Amostras consideradas resistentes com base no valor de MIC ou no tamanho dos halos de resistência, com base na interpretação dos autores.

Além da terapia antimicrobiana, o controle da pasteurelose inclui o uso de medidas profiláticas que envolvem correções ambientais e melhorias nas práticas de manejo, além da vacinação (BOROWSKI et al., 2007).

## 2.2 Circovírus Suíno Tipo 2

### 2.2.1 Etiologia

O circovírus suíno tipo 2 é um agente de distribuição mundial (MORÉS et al., 2007a) pertencente à família *Circoviridae* que é composta principalmente por três membros: o vírus da anemia infecciosa das galinhas, o vírus da doença das penas e bico dos psitacídeos e o circovírus suíno (TODD, 2000), mas o suíno ainda é a única espécie de mamífero onde o vírus já foi isolado (ZANELLA, 2006). Duas espécies de circovírus suíno já foram descritas. O circovírus suíno tipo 1 (PCV1) e o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). O PCV1 não é patogênico e é conhecido há vários anos como contaminante de cultura de células de rim suíno (THIRY, 2005). O PCV2 é um vírus disseminado em suídeos domésticos e silvestres e pode ser diagnosticado em rebanhos de diferentes padrões sanitários. Afeta suínos de diferentes plantéis, tanto de ciclo completo como unidades produtoras de leitões, de

tamanhos variados ou unidades de segundo ou terceiro sítios de produção como crechários e terminadores (MORÉS et al., 2007b).

Com exceção do PCV1, a infecção com circovírus é associada com doenças potencialmente fatais, nas quais a lesão nos tecidos linfóides e a imunossupressão é freqüente (ZANELLA, 2006). O PCV2 é responsável por diversas manifestações clínicas ou síndromes, destacando-se a Síndrome Multissistêmica do Definhamento Suíno (SMDS) (MORÉS et al., 2007a). Também são comuns os quadros de infecções bacterianas secundárias, como a doença de Glässer, pasteurelose pulmonar, colibacilose e salmonelose, entre outras (BARCELLOS, 2006). Além da SMDS o PCV2 também causa a Síndrome Dermatite e Nefropatia dos Suínos e outras doenças associadas a problemas nervosos, reprodutivos, pneumonias e enterites, porém ainda não se sabe com certeza se ele é o único agente envolvido (MORÉS, 2006). Estudos epidemiológicos não foram capazes de identificar, até o presente momento, quaisquer co-fatores, incluindo novos agentes e práticas da indústria moderna, que possam, em particular, terem aumentado a predisposição dos rebanhos a SMDS nos últimos anos (HASSLUNG et al., 2005).

A SMDS foi primeiramente identificada em 1991 e descrita em 1996, em um rebanho de alto padrão sanitário, situado na região oeste do Canadá (HARDING & CLARK, 1997). O termo SMDS foi proposto na ocasião para descrever a condição clínica dos leitões examinados, que se caracterizava por definhamento e palidez na fase de creche e por apresentação de lesões em múltiplos órgãos, especialmente nos tecidos linfóides (HARDING et al., 1998). A SMDS foi diagnosticada quase na mesma época nos Estados Unidos e Europa, entretanto, em estudos retroativos foi constatado que a infecção por PCV2 nos suínos é muito mais antiga: na Bélgica desde 1969, na Irlanda desde 1973 e no Canadá e Espanha desde 1986 (MORÉS, 2006). No Brasil, o primeiro registro da circovirose foi de 2000, mas a circovirose foi diagnosticada em materiais de arquivo de 1988, sugerindo que a infecção já estava presente desde aquela época (ZANELLA, 2006). Posteriormente, a doença foi descrita no Rio Grande do Sul em 2002 por Pescador et al.(2003), e a partir daí vem sendo registrada em quase todos os estados brasileiros (BARCELLOS, 2006). Questiona-se por que as doenças associadas ao PCV2 de um momento para o outro se tornaram a principal doença econômica mundial para a suinocultura (ZANELLA, 2006).

### 2.2.2 Importância econômica

A SMDS atualmente provoca um grande impacto econômico à suinocultura mundial (MORÉS et al., 2007a). Estima-se que as doenças relacionadas ao PCV2 custem cerca de 600 milhões de Euros por ano para a União Européia. As perdas diretas são resultantes de mortalidade nas fases de recria/ terminação e de leitões que não atingem o peso de abate. Perdas indiretas são provenientes do uso aumentado de antibióticos na tentativa de controlar infecções bacterianas concomitantes e de mudanças nas práticas de manejo na tentativa de minimizar o impacto da SMDS no rebanho (SEGALÉS, ALLAN, DOMINGO, 2005). Além disso, há enorme efeito negativo sobre o entusiasmo dos funcionários e produtores, pois medidas de controle são frustrantes e possuem efeito benéfico apenas a médio e longo prazos (MORÉS, 2006).

### 2.2.3 Epidemiologia

Os circovírus são vírus pequenos com cerca de 17 nm, não envelopados, icosaédricos e o genoma, DNA circular de fita simples, em torno de 1,76 Kb, é um dos menores entre os vírus animais (MORÉS et al., 2007b). Seu nome foi proposto por Tischer e colegas, em reconhecimento a que este foi o primeiro vírus animal contendo um genoma circular de DNA, sendo este nome posteriormente adotado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus quando os *Circoviridae* foram descritos como uma família distinta de vírus (ZANELLA, 2006). A densidade das partículas virais é de 1,36-1,37 g/mL em gradiente de cloreto de céσιο, o vírus não possui atividade hemaglutinante e é resistente ao clorofórmio, temperaturas altas e pH igual ou maior que três (ALLAN et al., 1994).

A transmissão do PCV2 por via oronasal é provavelmente a mais freqüente, essa tem sido a forma utilizada com êxito na maioria dos trabalhos que descrevem a infecção experimental da SMDS em suínos (SEGALÉS, ALLAN, DOMINGO, 2005). O PCV2 também é excretado nas fezes até 13 dias após a infecção. O contato com suínos infectados, instalações, equipamentos, pessoal contaminado e fômites pode também se constituir em importante forma de infecção (MORÉS et al., 2007b). O DNA do PCV2 pode ser encontrado no sêmen de machos infectados, mas ainda não está definido se esses achados indicam a presença de partículas virais infecciosas. Se isso for verdadeiro, estes animais podem representar uma fonte potencial de disseminação da infecção quando matrizes soronegativas forem infectadas durante a cobertura ou

inseminação com sêmen de cachaços positivos (MORÉS et al., 2007b). A associação do PCV2 com abortos e natimortos indica que a transmissão vertical transplacentária também pode ser importante (ZANELLA & MORÉS, 2003).

A SMDS atinge, predominantemente, leitões entre 5 a 12 semanas de idade, embora a doença já tenha sido descrita em leitões de 1 a 6 meses. A morbidade e a mortalidade variam de 70-80% e 4-30% respectivamente, de acordo com a granja, fase em que o surto aparece e o manejo empregado na criação (MORÉS et al., 2007b). Fatores de risco causadores de estresse como densidade elevada, baixa qualidade do ar, ar seco, mistura de lotes com idades diferentes podem exacerbar os sintomas e a gravidade da doença (ZANELLA, 2006). Dos suínos afetados (cerca de 50%) morrem em menos de 8 dias e os demais sobrevivem, mas a maioria evolui para definhamento extremo, sem possibilidade de recuperação (MORÉS et al., 2007b).

#### **2.2.4 Aspectos Genéticos**

As seqüências genômicas dos PCV1 e PCV2 se assemelham em menos de 80% entre si. Porém análises do genoma de vários isolados de PCV2 da Europa, América do Norte, sudeste asiático e do Brasil concluíram que estes são muito semelhantes, em média com 96% de homologia entre os isolados (MORÉS et al., 2007b). No genoma do PCV2 já foram identificados três ORFs (fases abertas de leitura), ORF1, ORF2 e ORF3. A ORF1 codifica uma proteína (Rep), essencial para a replicação do DNA viral, enquanto que a ORF2 codifica proteína estrutural do capsídeo viral (Cap1), com massa molecular de 30 kDa. A ORF3 codifica uma proteína viral (Cap2) não essencial para a replicação, mas com papel importante na indução de apoptose através da ativação de mecanismos das captases 8 e 3 que induzem à morte celular (MORÉS et al., 2007b). Índícios sugerem que esta proteína teria um papel importante na patogenia da infecção (LIU et al., 2006).

#### **2.2.5 Isolamento Viral**

O isolamento viral pode ser realizado em células de linhagem como PK-15 (rins de suíno), ST (testículo de suíno), SK-6 (rins de suíno), porém o vírus preferencialmente replica naquelas células que estão em proliferação ativa, ou seja, na fase S do ciclo celular (ZANELLA, 2006). O PCV2 não causa efeito citopático nestas células, sendo assim, é necessário que a presença seja comprovada por detecção de

antígenos virais, através de imunofluorescência, imunoperoxidase ou testes moleculares, como PCR (ZANELLA, 2006).

### **2.2.6 Patogenia**

A patogenia do PCV2 e sua participação na SMDS permanece pouco compreendida. A presença do PCV2 é demonstrada em monócitos, macrófagos e células dendríticas foliculares, mas sua replicação nestas células não. A possibilidade do PCV2 tirar vantagem da natureza fagocítica dos macrófagos para facilitar a sua disseminação é sugerida. O agente infeccioso se aproveita de mecanismos de defesa para se disseminar pelo animal. Os monócitos infectados podem atuar como reservatórios de vírus, espalhando o vírus pelos sistemas, incluindo os órgãos linfóides, além de impossibilitar o contato do PCV2 com os anticorpos específicos (DRIEMEIER, 2006). A depleção linfocítica dos órgãos linfóides não é causada pelo efeito citopático direto do PCV2, pois ele não replica em linfócitos. No entanto, depleção linfocítica e leucopenia são as principais lesões histológicas encontradas tanto em animais subclínicamente infectados pelo PCV2, bem como em animais acometidos pela SMDS (DRIEMEIER, 2006).

As rotas de excreção do PCV2 que têm sido descritas incluem a bronquial, nasal, tonsilar, fecal e urinária (CALSAMIGLIA et al., 2004). O PCV2 também foi incluído na lista dos vírus que causam infecção transplacentária em porcas (PENSAERT et al., 2004) causando morte fetal e abortos associados com a infecção uterina (WEST et al., 1999), e essas alterações foram reproduzidas com a inoculação intra-uterina do PCV2 em fetos em desenvolvimento (SANCHEZ et al., 2001).

### **2.2.7 Sinais Clínicos**

O principal sinal clínico da doença é a perda progressiva de peso, mas com frequência também é observada dispnéia, aumento dos linfonodos inguinais superficiais, palidez, diarreia e, ocasionalmente icterícia (SEGALÉS, ALLAN, DOMINGO, 2005). Muitos dos sinais da doença são inespecíficos. Existem numerosas outras doenças que apresentam emagrecimento progressivo, sinais respiratórios e diarreia. Em analogia, muitos dos animais necropsiados não demonstram claramente os achados característicos da SMDS, então, uma forte suspeita da SMDS só pode ser obtida macroscopicamente quando do aparecimento significativo de lesões (CHAE, 2004).

Na necropsia, os principais achados são nos linfonodos, rins e pulmão. O pulmão se apresenta não colapsado ou “armado” e em boa parte dos casos, com consolidações

crânio-ventrais e edema interlobular. Todos os linfonodos e agregados linfóides se apresentam aumentados, mas mais notoriamente esse aumento é observado nos linfonodos inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos (ROSSEL et al., 1999). As lesões renais macroscópicas variam desde pequenos pontos brancos multifocais até grandes manchas coalescentes na região cortical, podendo a víscera estar ou não aumentada de volume, mas usualmente exibindo uma coloração mais pálida (ALLAN & ELLIS, 2000).

Na avaliação microscópica, a lesão característica da SMDS é a inflamação granulomatosa com células gigantes e, em alguns casos, numerosos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos nos tecidos linfóides como os linfonodos, baço e tonsilas. Numa pequena proporção de casos os linfonodos podem apresentar focos de necrose coalescentes claramente visíveis na macroscópica. Infiltrado linfoistiocitário ou granulomatoso, podendo ou não apresentar células gigantes, é também observado nos rins e pulmões (ALLAN & ELLIS, 2000).

Contudo, essas lesões não estão sempre presentes e não podem ser usadas isoladamente como critério diagnóstico. O diagnóstico final da SMDS é baseado em três critérios (QUINTANA et al., 2001): (a) a presença de sinais clínicos compatíveis, basicamente o definhamento; (b) presença de lesões histopatológicas compatíveis nos tecidos linfóides e (c) a presença de PCV2 (antígeno ou ácido nucléico) junto às lesões microscópicas.

No entanto, em granjas afetadas pela SMDS é possível se encontrar animais saudáveis com lesões microscópicas típicas de SMDS, de grau leve ou moderado e com pouca ou moderada quantidade de ácidos nucléicos de PCV2 (QUINTANA et al., 2001). Além disso, um percentual dos suínos afetados pela SMDS apresenta recuperação e, apesar da emaciação evidente dos animais nesse estágio crônico, a análise histopatológica revela discreta presença ou ausência de lesões compatíveis com a doença e também pouca quantidade de PCV2 nos tecidos linfóides. Por isso, o melhor material para se avaliar as lesões macro e microscópicas são provenientes de animais com uma semana de evolução clínica da doença (SEGALÉS et al., 2004).

### **2.2.8 Diagnóstico**

Para a detecção do PCV2 nos tecidos, têm sido empregadas técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (HIS), que permitem a análise da arquitetura

histológica em relação à presença do agente (CHAE, 2004). Ambos os testes são realizados em cortes histológicos preparados a partir de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina. Anticorpos mono ou policlonais têm sido utilizados para a IHQ e várias sondas foram desenvolvidas para a detecção do ácido nucléico do PCV2 (SORDEN, 2000). Em geral, a IHQ é mais rápida e econômica que a HIS, mas a HIS é menos suscetível às alterações estruturais causadas pela fixação em formalina (CHAE, 2004).

Praticamente todas as medidas de controle adotadas para reduzir as perdas com a circovirose têm sido baseadas nas recomendações de um autor francês, François Madec. Ele sugeriu os assim chamados “20 pontos de Madec”, que enumeram uma série de medidas de desinfecção, manejo, vazão sanitário e controle sanitário geral (BARCELLOS, 2006).

#### **2.2.9 PCV2 associado ao Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos**

O PCV2 também é associado ao Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS), que é caracterizado por atraso no desenvolvimento, diminuição na conversão alimentar, letargia, anorexia, febre, tosse e dispnéia. A pneumonia apresentada pelos animais com CDRS é causada por uma combinação de agentes bacterianos e virais tais como: vírus da influenza suína, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida*. A doença acomete animais entre 16-22 semanas de idade (DRIEMEIER, 2006). As lesões características de CDRS associada ao PCV2 são pneumonia broncointersticial com fibrose peribronquial e peribronquiolar. Os septos alveolares se apresentam espessos com um infiltrado linfocitário. Sobretudo, em muitos casos não há como diferenciar claramente CDRS da SMDS, pois a semelhança clínica é acentuada. O diagnóstico da CDRS associada com PCV2 deve ser diferenciado da SMDS obedecendo aos seguintes critérios: (a) sinais respiratórios e falta de resposta aos tratamentos antimicrobianos, (b) presença de lesões microscópicas características no pulmão, (c) detecção do PCV2 nas lesões pulmonares e (d) ausência de lesões características da SMDS nos tecidos linfóides (DRIEMEIER, 2006).

### **3 ARTIGO**

ARTIGO A SER APRESENTADO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA  
“PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA”

---

A formatação do artigo segue as normas da revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”.

Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pneumonic lesions associated or not with PCV2 infection in pigs.

Tiago Heres<sup>1\*</sup>, Sandra M. Borowski<sup>2</sup>, Priscila Zlotowski<sup>3</sup>, Priscilla Karina V. Koerich<sup>4</sup>, Brenda Maria P. P. Marques<sup>1</sup>, Bruno Marimon<sup>1</sup>, David Driemeier<sup>3</sup> e David E. S. N. de Barcellos<sup>1</sup>

**Abstract:** *Pasteurella multocida* is the etiologic agent of swine respiratory pasteurellosis and the infection occurs specially associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* in the course of enzootic pneumonia. The agent can be isolated from the lung of several animal species and man. Infection of pigs with porcine circovirus (PCV2) causes a systemic infection with deep effects on the lymphoid system (porcine multisystemic wasting syndrome, PMWS), resulting in impairment of the normal defense processes and facilitating secondary infections, including enzootic pneumonia complicated with *Pasteurella multocida*. The objective of the present work was to isolate and characterize strains of *P. multocida* obtained from pigs with clinical signs compatible with PMWS and from slaughter pigs, considering biochemical profile, capsular typing and antibiotic sensitivity testing. A total of 453 materials (lungs and swabs from lung lesions) were used, resulting in 115 bacterial isolates from 79 lungs. At the same time, the efficiency of the isolation of the bacteria from two different sites in the lung was assessed: bronchial exudate and the cut surface of the lung. In a sample of the cases it was tried to establish the relationship between PCV2 infection and lung lesions induced by *P. multocida*. Analyzing degrees of pneumonia, 38 lesions were classified as mild, 19 as intermediate and 15 as severe. In the bacteriological analysis, all strains were positive for catalase and oxidase, and negative for citrate and H<sub>2</sub>S, and 11.3 were negative in the indole test. Using sugar fermentation (sorbitol, manitol, trehalose, maltose and arabinose) six different profiles were established. Capsular type A was diagnosed in 93.91% of the samples and type D in 6.09%. All strains were negative for the gene codifying dermonecrotic toxin (*tox*A). Antimicrobial resistance was low, and tetracycline was the product showing higher resistance (15.65%).

**Index terms:** *Pasteurella multocida*, pneumonia, circovirus infection, characterization

<sup>1</sup> Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre – RS, 91540-000, Brasil. \* Autor para correspondência: [tiagoheres@bol.com.br](mailto:tiagoheres@bol.com.br)

<sup>2</sup> Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, RS/Brasil, 92990.000.

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia Animal, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS/Brasil, 91540.000.

<sup>4</sup> Laboratório de Saúde Animal, Perdigão Agroindustrial S/A. Rodovia Sc 453, Km 50, Videira, SC/Brasil, 89560-000.

## RESUMO

**[Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos.]**

Resumo: A *Pasteurella multocida* é o agente causador da pasteurelose pulmonar dos suínos, sendo comum a ocorrência dessa infecção associada com o *Mycoplasma hyopneumoniae* no curso da pneumonia enzoótica. O agente é encontrado em pulmões de várias espécies animais e no homem. A infecção de suínos com o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) causa uma forma de infecção sistêmica com profundos efeitos no sistema linfóide, causando prejuízos aos processos normais de defesa e facilitando a instalação de infecções secundárias, incluindo a pneumonia enzoótica complicada pela *Pasteurella multocida*. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar amostras de *P. multocida* obtidas de suínos com sinais clínicos compatíveis com os da circovirose e de animais de frigorífico quanto ao seu perfil bioquímico, capsular e sensibilidade a antimicrobianos. Foi utilizado um total de 453 materiais (pulmões e suabes das lesões pulmonares), resultando em 115 isolados bacterianos de 79 pulmões. Paralelamente, procurou-se avaliar a eficiência do isolamento da bactéria a partir de dois sítios de amostragem no pulmão: do exsudato bronquial e da superfície de corte pulmonar. Numa amostragem dos casos, procurou-se estabelecer a relação entre a infecção com PCV2 e as lesões pulmonares induzidas pela *P. multocida*. Numa análise do grau de pneumonia foram classificadas 38 lesões como leves, 19 como médias e 15 graves. Na análise bacteriológica, todas as amostras foram positivas para o teste da catalase e oxidase e negativas para o citrato e H<sub>2</sub>S, e 11,3% foram negativas ao teste do indol. Utilizando-se os substratos sorbitol, manitol, trealose, maltose e arabinose foram observados seis perfis distintos. O tipo capsular A esteve presente em 93,91% das amostras e o tipo D em 6,09%. Nenhuma das amostras possuía o gene codificador da toxina dermonecrótica (*toxA*) e a resistência antimicrobiana foi baixa, sendo a oxitetraciclina o princípio ativo com maior resistência 15,65%.

Termos indexadores: *Pasteurella multocida*, pneumonia, circovirose, caracterização

## INTRODUÇÃO

A *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) causa a pasteurelose pulmonar dos suínos e é comum a ocorrência de infecções associadas com o *Mycoplasma* (*M.*) *hyopneumoniae* no curso da pneumonia enzoótica. A infecção pelo agente pode também ser predisposta por agentes virais como o circovírus suíno tipo 2 (PCV2, Kim et al., 2003).

As pneumonias em suínos apresentam alto custo (Pijoan, 2006) e são um dos principais problemas às granjas de suínos por causar mortalidade, atraso no desenvolvimento, falta de uniformidade dos lotes, condenação de carcaças e gasto com medicamentos (Borowski, 2006).

A *P. multocida* é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, oxidase positivo, imóvel, indol positivo. Não cresce em ágar Mac Conkey e não requer os fatores X e V para crescimento (Pijoan, 2006). O agente usualmente é incapaz de agir como patógeno primário, necessitando interagir com outros microorganismos para produzir pneumonia (Pijoan 2006). Entre as interações reconhecidas, a principal é com o *M. hyopneumoniae*, mas recentemente foi demonstrado um aumento da infecção com *Pasteurella* em associação com o PCV2 (Opriessnig et al., 2007).

A maioria dos isolados de *P. multocida* possui cápsula de polissacarídeo similar à encontrada em outras espécies bacterianas (Boyce et al., 2000) e com base na sua análise, existem cinco sorotipos capsulares, A, B, D, E e F. Entre esses, os sorotipos A, B, D e F já foram detectados em suínos (Borowski et al., 2007). O sorotipo A tem sido o mais comumente associado a quadros de pneumonia (Pijoan, 2006). Entretanto, nos últimos anos, tem aumentado o registro de isolamentos de *P. multocida* tipo D associados com processos pneumônicos (Borowski et al., 2007). Num levantamento realizado por essa autora no Brasil em 2001, amostras do tipo D foram detectadas em 4,17% dos casos. Também no Brasil, em 2006, foram estudadas 77 amostras isoladas de pulmões de suínos desviados pelo Serviço de Inspeção Federal e 41 (53,2%) das amostras foram classificadas como pertencentes ao tipo capsular D (Mores, 2006). Nos Estados Unidos, em 1996 os isolamentos do tipo D eram menores do que 2% e em 2003 já ultrapassavam 33% (Jordan et al., 2006).

Dois tipos de toxinas são produzidos pela *P. multocida*: endotoxina e toxina protéica (Borowski, 2001). A exotoxina é conhecida como toxina dermonecrótica e é produzida principalmente pelo sorotipo capsular D. É codificada pelo gene *toxA*

(Lichtensteiger et al., 1996) e sua ação patogênica está mais relacionada com a rinite atrófica progressiva (Davies et al., 2003). Alguns autores registraram o isolamento a partir de pulmões de suínos de amostras expressando a exotoxina (Pijoan et al., 1984), entretanto, essa característica não pareceu ser importante para a reprodução experimental da pneumonia por *P. multocida* (Baekbo, 1988). Amostras toxigênicas e não toxigênicas de *P. multocida* não diferem nas reações bioquímicas ou na morfologia colonial (Lichtensteiger et al., 1996).

Estudos sobre a susceptibilidade antimicrobiana da *P. multocida* são escassos (Heim et al. 2005), tais dados são mais encontrados em resumos apresentados em congressos. Existe interesse no estudo da evolução da resistência aos antimicrobianos pela forma intensiva como esses produtos são usados na criação industrial de suínos.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar amostras de *P. multocida* quanto ao seu perfil bioquímico, capsular e sensibilidade frente a antimicrobianos, obtidas de suínos com sinais clínicos de circovirose e de animais de frigorífico. Foram também avaliados os tipos de lesões mais prevalentes nos pulmões e analisados dois métodos de coleta de amostras para a realização do exame bacteriológico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram examinados 152 pulmões com lesões obtidos a partir de 305 necropsias realizadas em animais com sinais clínicos compatíveis com os da infecção pelo PCV2 (circovirose). Foram também coletados materiais de 78 animais da linha de abate em duas visitas a frigoríficos. Nessas ocasiões, foram examinados dois lotes de aproximadamente 500 animais, amostrando cada segundo pulmão com lesão de pneumonia, deixando passar o próximo lesionado. No total foram coletados 453 materiais, sendo, 152 pulmões de animais com sinais clínicos de circovirose e 78 de animais de frigorífico, e 223 suabes de brônquios (78 de animais de frigorífico e 145 de animais necropsiados). Durante a coleta das amostras os pulmões foram fotografados para posterior avaliação das lesões macroscópicas e áreas de consolidação pulmonar.

As amostras de tecido pulmonar foram coletadas e mantidas sob refrigeração por no máximo 24 horas até a realização dos exames bacteriológicos. Uma segunda amostra foi coletada em formol a 10%, para exames de histopatologia e de imuno-histoquímica para PCV2 e *M. hyopneumoniae*. As amostras permaneceram em formol 10% por um período mínimo de 72 horas antes de se realizar as desidratações correspondentes em

álcool a 50% (3 lavagens) e álcool a 70%; seções menores foram embebidas em parafina e subsequentemente foram moldados os blocos de parafina. A partir dos mesmos, com o uso de um micrótomo, foram realizados cortes histológicos, os quais foram montados sobre uma lâmina de microscopia. A partir destas, foi realizada a coloração com hematoxilina-eosina, conforme descrito por Allen (1992). A técnica de imuno-histoquímica, para PCV2 foi realizada conforme adaptação de Sorden et al. (1999) e para *M. hyopneumoniae*, foi realizado conforme protocolo de Castro (2008 – dados não publicados).

Macroscopicamente foi avaliado o grau de pneumonia (áreas de consolidação pulmonares), classificando as lesões em três categorias: leve, média e grave. Cada lobo pulmonar foi avaliado em separado. Foram atribuídas notas que variaram de zero a quatro, com o seguinte significado: zero (lobo sem lesões de consolidação), um (até 25% do lobo afetado), dois (entre 26 e 50% do lobo afetado), três (entre 51 e 75% do lobo atingido) e quatro (mais de 76% do lobo consolidado). Em seguida foi feita a classificação em leve, médio e grave, sendo que leve significava que apenas um lobo havia recebido pontuação três ou quatro, médio até três lobos com pontuações acima de três e grave quando mais de três lobos receberam pontuações acima de três. Além do grau de pneumonia, lesões de pleurite e abscessos também foram anotadas.

As amostras de secreção dos brônquios foram semeadas em ágar sangue ovino a 5% e ágar Mac Conkey e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As amostras de tecido pulmonar foram flambadas com álcool 70°GL. A seguir, com o auxílio de bisturi, foi realizada incisão para expor a superfície de tecido (superfície de corte) onde ocorreu coleta do material, passando-se a alça de platina no tecido exposto e semeando a seguir em ágar sangue a Mac Conkey. Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram repicadas em ágar sangue ovino para obtenção de massa bacteriana e foram congeladas em meio para liofilização sugerido por Borowski (2001), para análise posterior e armazenamento. Durante as atividades do presente estudo, não buscou-se identificar outros agentes que crescessem durante o período de incubação.

A caracterização bioquímica das amostras foi realizada usando as reações de fermentação dos seguintes substratos: xilose, arabinose, maltose, trealose, sorbitol, manitol e dulcitol. Também foi avaliada a produção da oxidase, catalase, indol, H<sub>2</sub>S, presença de motilidade e utilização do citrato. Todas as provas bioquímicas foram realizadas como descrito por Barrow & Feltham (1993).

Para verificar a presença de ácido hialurônico na cápsula, característica da *P. multocida* sorotipo A, foi usada a técnica descrita por Carter & Rundell (1975) que avalia a despolimerização da cápsula em presença de uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de hialuronidase. Na análise capsular do sorotipo D, foi empregada a técnica descrita por Carter & Subronto (1973), que se baseia na aglutinação do sobrenadante do cultivo da bactéria na presença de acriflavina neutra na diluição 1:1000.

Nas amostras isoladas foi realizada a amplificação do gene codificador da toxina dermonecrótica (*toxA*) através da técnica de PCR, usando a técnica descrita por Borowski et al. (2001).

A susceptibilidade *in vitro* das amostras de *P. multocida* frente aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton, segundo a técnica de Bauer & Kirby (1966). As amostras foram testadas frente aos antimicrobianos que usualmente são usados para o controle da pasteurelose em suínos, nas concentrações indicadas: amoxicilina 30µg; oxitetraciclina 30µg; ceftiofur 30µg; tilmicosina 15µg; enrofloxacin 5µg; espectinomicina 100µg; canamicina 30µg; sulfatrimetoprima 25µg e neomicina 35µg. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com as instruções dos laboratórios fabricantes dos princípios ativos, sendo que, todas amostras que se encontravam nos níveis intermediários de resistência foram consideradas resistentes ao princípio ativo testado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 115 isolamentos de *P. multocida*, 48 de pulmões de animais com sinais clínicos compatíveis com a infecção com PCV2 e 67 de pulmões coletados em frigorífico. Entre as amostras isoladas, 38 (33,04%) cresceram em cultivo misto e 77 (66,96%) em cultura pura. Existe uma microbiota normal no pulmão do suíno, o que pode ter influenciado os resultados dos exames, além do fato de que as técnicas usadas na necropsia ou no abate dos animais no frigorífico favorecem a contaminação do meio aéreo pulmonar, dificultando a obtenção de amostras não contaminadas (Ganter et al., 1990).

Na análise dos dois métodos de coleta de amostras para a realização do exame bacteriológico, entre as 115 amostras avaliadas, 60 (52,17%) dos isolamentos foram obtidos do parênquima pulmonar e 55 (47,83%) de suabes bronquiais. Entre esses, 25

(21,74%) foram isolados exclusivos do parênquima pulmonar, 20 (17,39%) apenas de suabes bronquiais e 70 (60,87%) simultaneamente de suabes e tecidos pulmonares. O nosso estudo foi feito para verificar se numa determinada localização (em brônquios ou nas áreas alveolares) haveria maior concentração de *P. multocida*, o que poderia ocorrer considerando que a bactéria adere a receptores no muco e, conseqüentemente, poderia estar presente em títulos mais altos em áreas com maior concentração dessa substância (nos brônquios). As diferenças obtidas não validaram a hipótese, assim que a amostragem para isolamento da bactéria poderá ser realizada indiferentemente de materiais coletados nos dois locais. Moorkamp et al. (2008) em seu estudo também não encontrou diferenças no isolamento de *P. multocida* feitas de suabes bronquiais ou do parênquima pulmonar.

Todas as 115 amostras classificadas como *P. multocida* na avaliação morfológica nas placas de ágar sangue foram confirmadas pelos testes bioquímicos convencionais como pertencentes a essa espécie bacteriana. Essa é uma observação importante, pois para a rotina básica de isolamento da *P. multocida* a simples verificação das características coloniais na placa de ágar sangue associada com a falta de crescimento em placas do meio Mac Conkey permite emitir, com um grau razoável de precisão, um diagnóstico de infecção por essa bactéria. Através da PCR, nenhuma amostra amplificou segmento do gene *toxA* com o uso do primer selecionado. Resultados como estes já eram esperados, pois amostras toxigênicas de *P. multocida* tipo A são relativamente incomuns (Davies et al., 2003; Pijoan, 2006).

Todos os pulmões analisados demonstraram, em maior ou menor grau, áreas de consolidação pulmonar compatíveis com os observados na pneumonia enzoótica. Considerando a análise das áreas de consolidação, 38 amostras foram classificadas na categoria leve do grau de pneumonia, 19 na categoria média e 15 na categoria grave. Os valores atribuídos a cada lobo pulmonar e quantas vezes esse valor se repetiu podem ser observados na Tabela 1, imagens representativas para os graus leve, médio e grave podem ser observados nas Figuras 1 a 6. Ocorreu consolidação pulmonar em todos os graus e em todos os lobos. A observação mais relevante foi a diferença nas lesões entre os lobos apical direito e apical esquerdo. No lobo direito a ocorrência de consolidação pulmonar em grau quatro aconteceu em mais do que o dobro da observada no lobo esquerdo. Esse fato poderia ser explicado porque no lado direito do pulmão existe um brônquio acessório que representa o primeiro acesso aéreo ao pulmão, ausente no lado esquerdo. A presença desse brônquio numa posição mais cranial poderia propiciar a

disseminação de patógenos pela via aerógena de uma maneira mais acentuada ao lado direito do pulmão que ao esquerdo, que não o possui.

Além das áreas de consolidação pulmonar, oito pulmões (11,11%) apresentaram pleurite e quatro (5,55%) abscessos. Pleurite e abscessos encontram-se entre as principais causas de rejeição total de carcaças em matadouros-frigoríficos, juntamente com peritonite, febre e artrite. Abscessos e artrites também podem ser responsáveis por perdas parciais de carcaças (Araújo, 2004).

A análise histopatológica foi realizada em 89 amostras, Tabela 2. Broncopneumonia purulenta foi o achado microscópico mais comum, presente em 67 (75,3%) amostras. A pneumonia intersticial foi encontrada em 18 (24,7%) amostras, sendo que em 12 ambos os tipos de pneumonia ocorreram concomitantemente. Pleurite e edema estavam presentes em 19 e 10 amostras, respectivamente. Foi possível observar que as amostras coletadas de leitões com sinais clínicos compatíveis com os da infecção pelo PCV2 (circovirose), com exceção da hiperplasia do BALT (tecido linfóide associado aos brônquios), apresentaram valores superiores para todas as lesões quando comparados com as amostras coletadas em frigorífico. Uma explicação para esse achado seria o fato de que as amostras coletadas em frigoríficos eram oriundas de leitões clinicamente normais e aquelas que mostraram na histopatologia lesões mais severas provinham de animais clinicamente doentes. Em menor quantidade também foi observada: deposição de fibrina (1 amostra), áreas de necrose (5 amostras) e proliferação de tecido linfóide (4 amostras).

Foram selecionados para a realização do teste de imuno-histoquímica para PCV2 14 amostras e para o *M. hyopneumoniae* 10, sendo diagnosticados três casos positivos para cada agente, Tabela 3. Se forem avaliados o número de reagentes positivos apenas com o número de amostras testadas, temos 21,42% de amostras positivas para PCV2 e 30% de amostras positivas para *M. hyopneumoniae*. Esperava-se encontrar um número maior de reagentes positivos para PCV2 e *M. hyopneumoniae* entre os animais com sinais clínicos de definhamento (grupo de leitões necropsiados). A presença de apenas 2 leitões com infecção por PCV2 entre 9 positivos para *Pasteurella multocida* (22,22%) e nenhum para *Mycoplasma hyopneumoniae* entre leitões com sinais de definhamento pode significar uma baixa associação entre a *P. multocida* e esses agentes, refutando a hipótese da maior ocorrência da infecção por *P. multocida* na presença da imunodepressão induzida pelos dois agentes infecciosos. Nas amostras oriundas de frigorífico foi observada uma associação similar com o PCV2, mas maior para *M.*

*hyopneumoniae* e *P. multocida* (50%). Pelo pequeno número das amostras analisadas fica difícil a generalização dessas observações, para uma conclusão mais definitiva seriam necessários novos estudos envolvendo um maior número de amostras.

Durante a realização das provas de oxidase e catalase, todas as amostras demonstraram reação positiva e para o teste do citrato, todas as amostras foram negativas. Resultados similares foram obtidos por Borowski (2001).

Utilizando o meio de SIM, nenhuma das amostras demonstrou possuir motilidade ou produzir o H<sub>2</sub>S. Porém, durante a determinação do indol, 13 (11,3%) amostras foram negativas e 102 (88,7%) positivas. Cabe salientar que das 102 amostras positivas 37 (36,24%) demonstram um halo negativo, mas ocorreu reação positiva na coluna de crescimento do agente no meio de cultura. Esse fenômeno foi considerado como reação positiva ao indol. Vera Lizarazo et al. (2008) analisando 60 amostras de *P. multocida*, encontrou 16 amostras não produtoras de indol.

Seis perfis distintos foram observados durante a fermentação dos substratos sorbitol, manitol, trealose, maltose e arabinose, conforme Tabela 4. Os substratos xilose e dulcitol não demonstraram reação com nenhuma das amostras. Os substratos sorbitol e manitol foram utilizados por praticamente todas as amostras testadas (110 e 112, respectivamente). A trealose foi o terceiro substrato mais utilizado, obtendo reação positiva com nove isolados. A maltose e a arabinose reagiram positivamente com apenas uma amostra cada. A combinação de substratos que mais ocorreu foi entre o sorbitol e o manitol, com 104 amostras reagentes aos dois substratos. A segunda combinação mais registrada foi entre os substratos sorbitol, manitol e trealose, com 6 amostras reagentes. Borowski (2001) obteve resultados similares, encontrando cinco perfis distintos. Em seu trabalho, a autora relata resultados positivos para os substratos xilose e dulcitol, o que não ocorreu no nosso estudo. Vera Lizarazo et al. (2008) encontraram 16 amostras de *P. multocida* do tipo capsular A que não fermentavam o sorbitol e o manitol.

Baseado nas reações de fermentação dos substratos sorbitol e dulcitol, pode-se diferenciar a *Pasteurella multocida* em três subespécies: *multocida* (fermenta apenas sorbitol), *septica* (não fermenta nenhum dos dois substratos) e *gallicida* (fermenta ambos substratos) (Mutters et al., 1985). Pelos nossos resultados, as amostras puderam ser diferenciadas em duas subespécies *P. multocida* subespécie *multocida* (111 amostras) e *P. multocida* subespécie *septica* (4 amostras). De acordo com Mutters et al. (1985), a subespécie *multocida* estaria mais envolvida com casos de pasteurelose animal

e humana, enquanto que a subespécie *septica* incluiria amostras de várias origens como felinos, caninos e aves. Esses resultados já eram esperados, pois em outros estudos acima de 90% das amostras isoladas de casos de pneumonia em suínos a subespécie *multocida* foi a mais isolada (Blackall et al., 1997; Borowski, 2001).

O tipo capsular A foi predominante entre as 115 amostras estudadas, ocorrendo em 108 (93,91%) isolados, enquanto que 7 (6,09%) amostras foram identificadas como pertencente ao tipo capsular D. A distribuição dos tipos capsulares referente à forma de coleta das amostras, parênquima ou suabe, é apresentada na Tabela 5. Como pode ser observado, nenhum tipo capsular predominou quando se leva em consideração a forma da coleta da amostra. Em 2006 Mores obteve 53,2% de isolamento de amostras de *P. multocida* tipo D em pulmões de animais desviados da linha de abate pelo serviço de inspeção sanitária, por conterem nódulos purulentos, nódulos necróticos, pleurites, abscessos e hepatização. O alto índice de amostras do tipo D encontrado pelo autor, sugere que talvez possa existir alguma correlação entre *P. multocida* tipo D e essas lesões.

Os resultados obtidos para o teste de resistência aos antimicrobianos constam da Tabela 6. As amostras de *P. multocida* utilizadas neste estudo demonstraram pouca resistência aos antimicrobianos utilizados. Os princípios ativos enrofloxacina e ceftiofur não apresentaram resistência com nenhuma amostra testada. A maior resistência observada foi para a oxitetraciclina (18 amostras, 15,65%). Para os demais princípios a resistência apresentada foi: 7 (6,09%) para neomicina, 4 (3,48%) para tilmicosina, 3 (2,61%) para canamicina, 2 (1,74%) para espectinomicina, 2 (1,74%) para sulfa-trimetoprima e 1 (0,87%) para amoxicilina. Em relação à resistência cruzada, ocorreram cinco diferentes interações entre os princípios estudados, embora esse fato tenha sido registrado em um número baixo de amostras (6, 5,22%). Dentre os antimicrobianos utilizados, a oxitetraciclina, a neomicina e a tilmicosina foram os princípios que mais se envolveram em resistência cruzada, três cada um. A canamicina, a espectinomicina e a sulfa-trimetoprima interagiram em dois arranjos cada um, e a amoxicilina envolveu-se em apenas uma interação. O número máximo de antimicrobianos envolvidos em resistência cruzada foi de seis princípios, isso foi verificado com uma amostra. Com três princípios envolvidos tivemos duas interações, envolvendo uma amostra em cada uma das interações. Três amostras apresentaram interações com somente dois princípios ativos através de duas interações, onde, duas amostras encontram-se em um arranjo e a outra em uma segunda interação. Os antimicrobianos neomicina e oxitetraciclina além

de serem os princípios que mais interagiram, também foram os que obtiveram o maior número de amostras envolvidas em algum tipo de arranjo. Utilizando os mesmos princípios ativos, Borowski (2001) obteve um índice de resistência bem maior do que o encontrado no presente estudo. A autora encontrou 18 perfis diferentes de resistência, sendo a espectinomicina o princípio ativo com maior grau de resistência encontrada. Um estudo realizado por Kaspar (2006), na Alemanha, mostrou que amostras de *P. multocida* isoladas de suínos demonstraram baixa resistência aos 19 antimicrobianos utilizados, sendo a sulfa-trimetoprima o princípio com a maior resistência com 28,1% das amostras resistentes. Abilleira et al. (2008) estudando 61 isolados de *P. multocida* encontrou amostras resistentes aos antimicrobianos oxitetraciclina, estreptomicina e sulfa-trimetoprima, sendo a oxitetraciclina o antimicrobiano com maior índice de resistência.

## CONCLUSÕES

- 1) A *P. multocida* foi isolada em cultura pura na maioria dos casos de pneumonia;
- 2) Não houve diferença em relação ao isolamento de *P. multocida* usando a amostragem obtida da superfície de corte do parênquima pulmonar ou de suabes de secreções bronquiais;
- 3) Nenhuma das amostras estudadas amplificou o gene *toxA* na reação de PCR;
- 4) A broncopneumonia purulenta foi o achado microscópico mais presente durante a realização do estudo;
- 5) Ocorreu maior frequência de isolamento da *P. multocida* subespécie *multocida* do que de *P. multocida* subespécie *septica*;
- 6) O tipo capsular A esteve mais presente que o tipo D;
- 7) Os isolamentos de *P. multocida* demonstraram possuir baixa resistência aos antimicrobianos testados;
- 8) O antimicrobiano com maior índice de resistência foi a oxitetraciclina.

## Bibliografia

Abilleira, F.S., Musskopf, G., Fauth, E.E., Silva Jr., V.B., Scartezzini, M., Vogt F.I., Ikuta, N., Fallavena, L.C.B., Rodrigues, N.C., Oliveira, S.J. Análise Bacteriológica de Casos de Aderência Pulmonar em Carcaças de Suínos de Vários Lotes Abatidos em

um Frigorífico no Rio Grande do Sul. 13º Congresso Brasileiro da ABRAVES, **Anais...** Florianópolis-SC, 2007

Allen, T. C. Hematoxylin and eosin. In: PROPHET, E B. et al. (Eds.). **Laboratory methods in histotechnology**. Washington D.C.: American Registry of Pathology. cap.9, p. 53-58, 1992.

Araújo, A. O. W.; Abscessos Pulmonares em Suínos Abatidos Industrialmente: Bacteriologia, Anatomopatologia e Relação Entre Portas de Entrada e Lesões Macroscópicas. Porto Alegre, Faculdade de Veterinária, 2004. 87 p. Dissertação de Mestrado, Conselho de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

Baekbo, P. Pathogenic properties of the *Pasteurella multocida* in the lungs of pigs. The significance of toxin production. In: International Pig Veterinary Society Congress, 10, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...**, Rio de Janeiro: International Pig Veterinary Society, p. 58, 1988.

Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria**. Third Edition, Cambridge University Press, 331 p., 1993.

Bauer, A. M. & Kirby, W. M. M. Antibiotic susceptibility by standartized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493-496, 1966.

Blackall, P. J.; Pahoff, J. L.; Bowles, R. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. **Veterinary Microbiology**, 57, 355-360, 1997.

Borowski, S.; Barcellos, D.; Morés, N. Pasteurelose pulmonar. In: **Doenças dos Suínos** / editores, Jurij Sobestiansky, David Barcellos. – Goiânia: Cãnone Editorial, p. 177-181, 2007.

Borowski, S. M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil

controle. In: **I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína**, Porto Alegre, 2006.

Borowski, S. M., Silva, S. C., Schrank, I. Cardoso, M. Toxin detection in *Pasteurella multocida* strains isolated from swine lungs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. UFRGS. 29(2):79-85. 2001

Borowski, S. M. Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, Faculdade de Veterinária, 2001. 190p. Tese de Doutorado, Conselho de Pós-graduação, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2001.

Boyce, J. D.; Chung, J. Y.; Adler, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. **Journal of Biotechnology**, 83, 153-160, 2000.

Carter, G. R.; Rundell, S. W. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **The Veterinary Record**, v. 87, p. 343, 1975.

Carter, G. R.; Subronto, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. **American Journal Veterinary Research**, v. 34, p. 293-294, 1973.

Castro, L. A. Dados não publicados, 2008.

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**. 52, 59-67, 2003.

Gunter, M.; Kipper, S.; Hensel, A. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage of live anaesthetized pigs. In: International Pig Veterinary Society, Lausanne – Switzerland, 1990, **Proceedings...** International Pig Veterinary Society, Lausanne – Switzerland, p109, 1990.

Heim, G.; Coutinho, T. A.; Asanome, W.; Barcellos, D. E. S. N. & Borowski, S. M. Susceptibilidade antimicrobiana de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos à tilmicosina. In: IVII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre, 2006. **Anais...** Porto Alegre, p. 117, 2005.

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.

Kaspar, H. Results of the antimicrobial agent susceptibility study raised in a representative, cross-sectional monitoring study on a national basis. **International Journal of Medical Microbiology**, 296, S2, 69-79, 2006.

Kim, J., Chung, H.-K., Chae, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal** 166, 251–256, 2003.

Lichtensteiger, C. A.; Steenbergen, S. M.; Lee, R. M.; Polson, D. D.; VIMR, E. R. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n°2, p. 3035-3039, 1996.

Moorkamp, L.; Nathues, H.; Spergser, J. Tegeler, R.; Beilage, E. G. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. **The veterinary Journal**, 175, 273-275, 2008.

Mores, M. A. Z. Anatomopatologia e Microbiologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de Carcaças em Suínos. Curitiba, Faculdade de veterinária, 2006. 77 p. Dissertação de mestrado, Conselho de Pós-Graduação, Universidade Federal do Paraná, 2006.

Mutters, R.; Ihm, P.; Pohl, S.; Frederiksen, W.; Manheim, W. Reclassification of the genus *Pasteurella* (Trevisan 1887) on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposal for the new species *Pasteurella dogmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. **International Journal Systematic Bacteriology**, 35, 309-322, 1985.

Pijoan, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: Leman, A. (Eds) **Disease of Swine**. 9<sup>a</sup> ed. Iowa; Iowa State University Press, p. 719-726, 2006.

Pijoan, C.; Lastra, A.; Ramirez, C.; Leman, A. D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n.º 5, p. 522-523, 1984.

Opriessnig, T.; Meng, X., Halbur, P. G. Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal Veterinarian Diagnostics Investigation** 19:591–615, 2007.

Sorden, S. D., Harms, P. A., Nawagitgul, P., Cavanaugh, D., Paul, P. S. Development of a Polyclonal-antibody-based Immunohistochemical Method for the Detection of Type 2 Porcine Circovirus in Formalin-fixed, paraffin-embedded Tissue. **Journal of Veterinarian Diagnostics Investigation**. 11 (6): 528-530, 1999.

Vera Lizarazo, Y. A.; Ferri, E. F. R.; Martín, C. B. G. Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. **Research in Veterinary Science** (2008), doi: 10.1016/j.rvsc.2008.02.002

## TABELAS

Tabela 1: Grau de consolidação pulmonar encontrado em lobos pulmonares

Grau	Lobos pulmonares						
	AE	CE	DE	AD	CD	DD	I
Zero	27	2	18	14	5	14	15
1	15	21	39	14	14	37	26
2	14	21	12	13	19	18	6
3	7	23	2	8	24	2	10
4	8	5	1	22	9	1	11
NA	1	zero	zero	1	1	Zero	4

NA: não avaliado; AD: apical direito; CD: cardíaco direito; DD: diafragmático direito; AE: apical esquerdo; CE: cardíaco esquerdo; DE: diafragmático esquerdo; I: intermediário.

Tabela 2: Análise histopatológica de 89 amostras de tecidos pulmonares provenientes de leitões necropsiados e de frigorífico, positivos ao isolamento de *P. multocida*

	PBPur	PI	Macro	Pleu	Hiper epi	EI	Cel Gi.	Trombos	Hiper BALT
Leitões necropsiados	44	11	29	18	5	7	6	6	zero
Leitões de frigorífico	23	7	19	1	2	3	2	zero	19
Total	67	18	48	19	7	10	8	6	19

PBPur: Pneumonia broncopurulenta; PI: Pneumonia intersticial; Macro: Macrófagos; Pleu: Pleurite; Hiper epi: Hiperplasia de epitélio; EI: Edema intersticial; Cel. Gi.: Células gigantes; Hiper BALT: Hiperplasia do BALT.

Tabela 3: Imuno-histoquímica para PCV2 e *M. hyopneumoniae* em animais positivos para *Pasteurella multocida*

	PCV2	<i>M. hyopneumoniae</i>
Leitões necropsiados	9 (2)*	4 (0)
Leitões de frigorífico	5 (1)	6 (3)
Total	14 (3)	10 (3)

\* Os números entre parênteses representam o total de amostras positivas.

Tabela 4: Perfis de fermentação de substratos apresentados por 115 amostras de *P. multocida*

n.º de amostras	Sorbitol	Manitol	Trealose	Maltose	Arabinose
104	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-
2	-	+	+	-	-
1	+	-	-	-	+
1	-	-	+	-	-
1	-	-	-	+	-

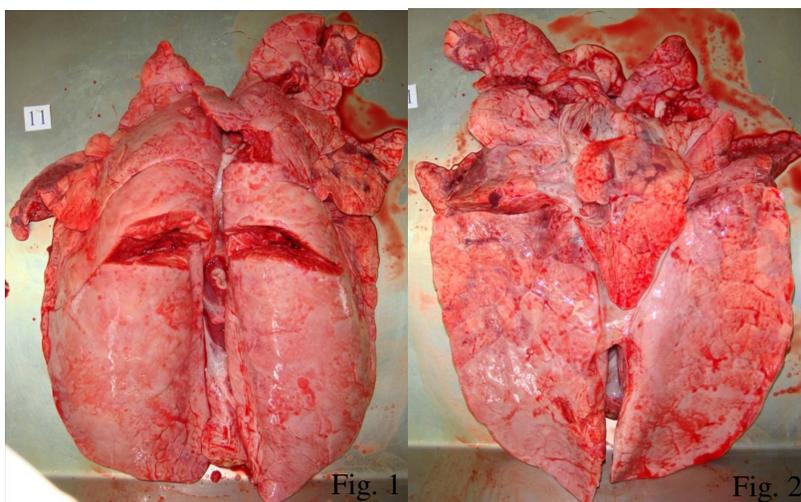
Tabela 5: Distribuição dos tipos capsulares de *P. multocida* conforme a forma de coleta do material

Tipo capsular	n.º de amostras	Parênquima	Suabe
A	108	57	51
D	7	3	4
Total	115	60	55

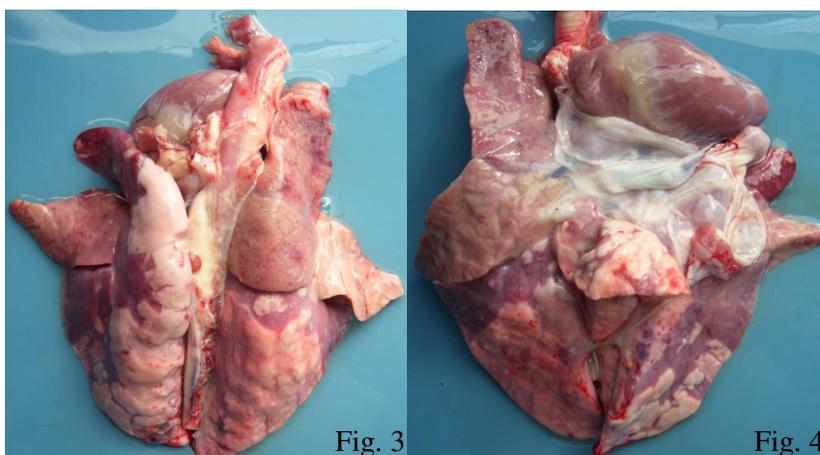
Tabela 6: Resistência antimicrobiana apresentada por amostras de *P. multocida* e interações entre os princípios ativos

n.º de amostras	Princípios ativos						
	TMC	SCT	CAN	AMO	EPT	NEO	OXT
1	X		X	X	X	X	X
1			X			X	X
1	X	X			X		
2						X	X
1	X	X					
14							X
3						X	
1			X				
1	X						
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>18</b>

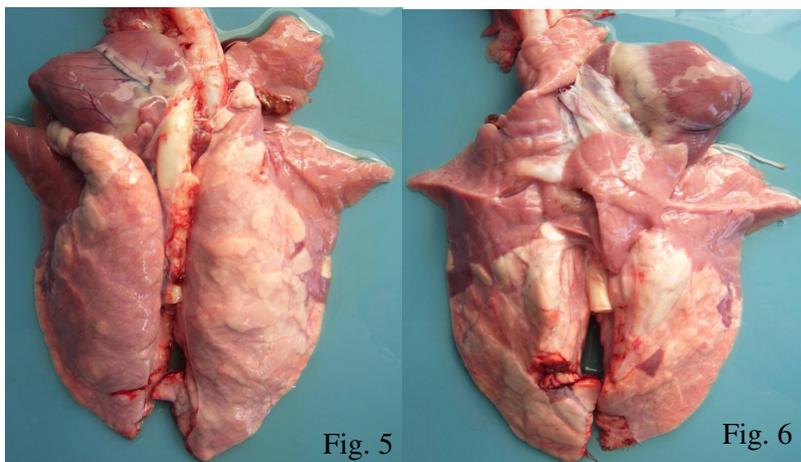
TCM: tilmicosina; SCT: sulfa-trimetoprima; CAN: canamicina; AMO: amoxicilina; EPT: espectinomicina; NEO: neomicina; OXT: oxitetraciclina.



Figuras 1 e 2: Frente e verso de pulmão representativo para classificação em grau leve de pneumonia.



Figuras 3 e 4: Frente e verso de pulmão representativo para classificação em grau médio de pneumonia.



Figuras 5 e 6: Frente e verso de pulmão representativo para classificação em grau grave de pneumonia.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Numa análise crítica do trabalho realizado e fazendo uma análise entre o que foi escrito aqui e o que foi proposto no projeto apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, julgo ter atingido os objetivos propostos e trabalhado com muitas técnicas que permitirão a futura realização de novos trabalhos na área de doenças respiratórias dos suínos.

De forma geral, os resultados obtidos confirmaram o que tem sido relatado na literatura. Uma característica inesperada foi a facilidade do reconhecimento e isolamento das amostras de *P. multocida* nas placas de cultivo primário de ágar sangue. Eu imaginava que teria maiores dificuldades em isolar o agente em decorrência da presença de outras bactérias, mas isso não ocorreu, nos casos em que havia mais de um tipo de um tipo de colônia a morfologia colonial era bem característica, gerando poucas dúvidas.

Imaginávamos que pudesse ocorrer maior isolamento em um dos tipos de coleta de material, suabe ou parênquima pulmonar, mas isso não foi evidenciado. O agente foi isolado em quantidades equivalentes nos dois sítios de amostragem.

Na literatura é relatado que amostras do tipo capsular A normalmente não são toxigênicas, mas que podem ocorrer em pequena quantidade no pulmão. Esse fato foi confirmado, embora também fosse esperada a presença de alguma amostra toxigênica.

Como já relatado na literatura, a *P. multocida* subespécie *multocida* foi a subespécie mais isolada. Também ocorreu o isolamento da subespécie *septica*, presente em quatro casos.

Durante a realização das provas bioquímicas, o fato mais marcante foi o aparecimento da positividade ao teste do indol na coluna de crescimento ao invés do halo na superfície do meio.

Referente a resistência frente aos antimicrobianos, uma baixa resistência já era esperada, sendo que os testes confirmaram a expectativa.

Novos trabalhos serão realizados e darão continuidade ao presente estudo. Em uma próxima etapa será buscada a tipificação somática dos isolados obtidos e a produção de uma vacina com o perfil antigênico mais próximo da realidade da suinocultura do estado do Rio Grande do Sul.

## 5 ANEXOS

Anexo 1: Fórmulas utilizadas no preparo dos reagentes.

### *Meio para liofilização*

Peptona caseína	25g
Sacarose	50g
Glutamato de sódio	10g
Água destilada	1000mL

Dissolver todos os componentes na água e esterilizar por filtração.

### *Indicador de Andrade*

Fuccina ácida	5g
Hidróxido de sódio	160mL
Água destilada	1000mL

Dissolver a fuccina em água fervente. Retirar do fogo e adicionar o hidróxido. Deixar em repouso por uma noite. Filtrar e armazenar em frasco âmbar.

### *Meio base para utilização de substratos*

Peptona bacteriológica	10g
Extrato de carne	3g
Cloreto de sódio	5g
Indicador de Andrade	10mL
Água destilada	1000mL

O açúcar a ser testado deve ser adicionado na quantidade de 1%. A esterilização deve ser feita através de vapor fluente durante 15 minutos.

Anexo 2: Trabalhos apresentados durante a PorkExpo 2008 & IV Fórum Internacional de Suinocultura. A formatação segue as normas do evento.

## Trabalho 1

### **AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE FRENTE A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE PNEUMONIAS EM SUÍNOS**

**Heres, T.\*<sup>1</sup>; Borowski, S. M.<sup>2</sup>; Barcellos, D. E. S. N.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Mestrando do programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, CEP: 91540-000, email: tiagoheres@bol.com.br; <sup>2</sup> Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul – RS; <sup>3</sup> Professor adjunto da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pasteurella multocida*; pneumonia; antimicrobianos; suínos.

#### **INTRODUÇÃO**

*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) é um cocobacilo Gram-negativo, pertencente à microbiota nasal de suínos e é extremamente difícil de ser erradicada (3). A pneumonia constitui-se uma doença de alto custo (3) e sob o ponto de vista econômico, as doenças respiratórias representam um dos principais problemas nas granjas de suínos. Os prejuízos acarretados pelas mesmas são decorrentes não somente da mortalidade de animais, mas repercutem também no atraso no desenvolvimento, falta de uniformidade dos lotes, condenação de carcaças no frigorífico e gasto com medicamentos (1) sendo que a pneumonia causada por *P. multocida* é a causa dos maiores prejuízos econômicos à indústria suína (5). Pneumonias causadas por *P. multocida* são muito frequentes, mas estudos voltados para epidemiologia, caracterização e susceptibilidade antimicrobiana deste patógeno são escassos (2). A terapia antimicrobiana é o método mais eficaz para o tratamento da pasteurelose animal e uma grande variedade de agentes antimicrobianos estão clinicamente disponíveis (4). O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de amostras *P. multocida* frente a antimicrobianos.

#### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os isolados foram obtidos através da necropsia de 250 suínos, realizada na Faculdade de Veterinária da UFRGS (em cinco etapas diferentes), sendo apenas 134 animais utilizados neste estudo e 38 amostras obtidas em frigorífico, resultando em 84 isolados de *P. multocida*. Todas as amostras foram semeadas através da técnica de difusão em ágar Müller Hinton segundo a técnica de Bauer & Kirby, e cultivadas por 18 a 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C, sendo testadas frente aos antimicrobianos, nas concentrações indicadas: amoxicilina 30µg; oxitetraciclina 30µg; ceftiofur 30µg; tilmicosina 15µg; enrofloxacin 5µg; espectinomicina 100µg; canamicina 30µg; sulfa-trimetoprima 25µg e neomicina 35µg. A leitura foi realizada utilizando-se os valores de resistência e sensibilidade fornecidos pelos fabricantes dos discos de princípios ativos. Para efeito deste estudo ou valores que se encontravam na faixa intermediária de resistência foram considerados como resistentes ao antimicrobiano testado.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 84 isolados testados, 61 (72,62%) não demonstraram resistência a nenhum dos antimicrobianos testados. Três amostras demonstraram resistência a tilmicosina, uma para enrofloxacin, uma para sulfa-trimetoprima, três para canamicina, duas para amoxicilina, duas para espectinomicina, oito para neomicina, quinze para oxitetraciclina e nenhuma para ceftiofur. Dentre todas as amostras, 17 apresentaram resistência a apenas um único antimicrobiano. Quanto à resistência múltipla, três amostras demonstraram serem resistentes a dois princípios. Dois isolados demonstraram resistência a três princípios e apenas uma amostra demonstrou resistência a seis princípios, dos nove utilizados. As interações entre a múltipla resistência podem ser observadas na tabela 1, sendo que a neomicina e oxitetraciclina foram os que apresentaram o maior número (quatro) de interações.

#### **CONCLUSÕES**

Os antimicrobianos utilizados no experimento não demonstraram possuir alto valor de resistência microbiana. A maioria das amostras que apresentou algum tipo de resistência antimicrobiana o teve em apenas um princípio. Os antimicrobianos neomicina e amoxicilina foram os princípios que apresentaram o maior grau de resistência e o maior número de interações com resistência múltipla.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOROWSKI, S. M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil controle. In: **I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína**, Porto Alegre, 2006.
2. HEIM, G.; COUTINHO, T. A.; ASANOME, W.; BARCELLOS, D. E. S. N. & BOROWSKI, S. M. Susceptibilidade antimicrobiana de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos à tilmicosina. In: **IVII Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre, 2006. **Anais...** Porto Alegre, 2005, p. 117.
3. PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: Leman, A. (Eds) **Disease of Swine**. 8ª ed. Iowa; Iowa State University Press, p. 511-520, 1999.
4. YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; ENDOH, Y. S. & KOJIMA, A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. **Journal Veterinary Medicine**. B 48, 555-560, 2001.
5. ZHAO, G.; PIJOAN, C.; MURTAUGH, M. P. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. In: **International Pig Veterinary Society Congress**, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: International Pig Veterinary Society, p. 157, 1992.

**Tabela 1.** Interação da múltipla resistência observada em seis amostras.

Nº. de amostras	Associação de antimicrobianos
1	Tilmicosina, canamicina, amoxicilina, espectinomicina, neomicina e oxitetraciclina
1	Canamicina, neomicina e oxitetraciclina
1	Tilmicosina, sulfa-trimetoprima e espectinomicina
1	Enrofloxacina e neomicina
2	Neomicina e oxitetraciclina

## Trabalho 2

### COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA ISOLAMENTO DE *Pasteurella multocida* DE PNEUMONIA EM SUÍNOS SUSPEITOS DE CIRCOVIROSE

Heres, T.\*<sup>1</sup>; Borowski, S. M.<sup>2</sup>; Souza, L. P.<sup>1</sup>; Barcellos, D. E. S. N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestrandos do programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, CEP: 91540-000, email: tiagoheres@bol.com.br; <sup>2</sup> Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul – RS; <sup>3</sup> Professor adjunto da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pasteurella multocida*; pneumonia; suínos; circovirose.

#### INTRODUÇÃO

A *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) é um agente bacteriano que tem sido encontrado em pulmões de suínos em diversos países, em vários tipos de clima e condições de criação (2). Está associada com rinite atrófica progressiva e como causa de pneumonias (3). A sua importância como agente primário de pneumonia em suínos tem sido bastante discutida. Segundo a maioria dos autores, o microorganismo é incapaz de agir como patógeno primário, necessitando da interação com outros agentes para produzir pneumonia (2). O Circovírus suíno tipo 2 (PCV2), é um agente que causa grande impacto econômico, e tem sido incriminado na ocorrência de patologias associadas a problemas nervosos, reprodutivos, pneumonias e enterites (3). Sob o ponto de vista econômico, as doenças respiratórias representam um dos principais problemas nas granjas de suínos. Os prejuízos acarretados pelas mesmas são decorrentes não somente da mortalidade de animais, mas repercutem também no atraso no desenvolvimento, falta de uniformidade dos lotes, condenação de carcaças no frigorífico e gasto com medicamentos (1). O presente trabalho objetivou isolar e caracterizar a *P. multocida* de casos de pneumonias em suínos, comparando dois locais de coleta de amostras: diretamente dos brônquios e do parênquima pulmonar (área bronquiolar e alveolar).

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 344 amostras em necropsias de suínos suspeitos de circovirose realizadas na Faculdade de Veterinária da UFRGS e de pulmões em frigorífico. As amostras de suabes com secreções bronquiais (172) foram imersas em tubos com o meio de transporte de Stuart e colocadas sob refrigeração, junto com as 172 amostras de tecido pulmonar. Os materiais foram semeados em ágar sangue ovino e ágar Mac Conkey e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 a 48 horas. Colônias suspeitas foram transferidas para ágar infusão de cérebro e coração (BHI) para obtenção de massa bacteriana para realização das provas de identificação bioquímica e tipagem do antígeno capsular através do teste da hialuronidase.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conseguiram-se 130 isolados (66 dos parênquimas pulmonares e 64 dos suabes bronquiais). Os dados obtidos demonstraram que em 50,58% dos pulmões coletados, não houve isolamento de *P. multocida* no parênquima nem no suabe bronquial e, em 49,42% isolou-se o agente, sendo que em 15,12% obteve-se isolamento no parênquima pulmonar, 11,63% nos suabes bronquiais e em 22,67% em ambos. Quanto às características do cultivo, 60,8% dos isolamentos foram obtidos através de cultura pura e 39,2% de cultura mista. Com relação ao perfil capsular, 93,94% das amostras de *P. multocida* isoladas foram diagnosticadas como pertencentes ao tipo A.

## CONCLUSÕES

Concluimos que os isolamentos através do parênquima pulmonar e do suabe bronquial possuem valores muito próximos e que na maioria dos casos onde o agente é isolado ele encontra-se em cultura pura. O perfil capsular mais encontrado foi o do tipo A.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOROWSKI, S. M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil controle. In: **I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína**, Porto Alegre, 2006. 2. BOROWSKI, S.; BARCELLOS, D. & MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. In: **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cànone Editorial, p. 177-181. 2007. 3. MORÉS, N. Epidemiologia da infecção pelo PCV2 em rebanhos do sul do Brasil. In: **I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína**, Porto Alegre, 2006. 4. PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: Leman, A. (Eds) **Disease of Swine**. 8ª ed. Iowa; Iowa State University Press, p. 511-520, 1999.

### Trabalho 3

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE SUÍNOS COM PNEUMONIA

Heres, T.<sup>\*1</sup>; Borowski, S. M.<sup>2</sup>; Marques, B. M. P. P.<sup>1</sup>; Barcellos, D. E. S. N.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestrandos do programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, CEP: 91540-000, email: tiagoheres@bol.com.br; <sup>2</sup> Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul – RS; <sup>3</sup> Professor adjunto da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pasteurella multocida*; pneumonia; suínos.

## INTRODUÇÃO

*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) é uma bactéria que tem sido isolada de várias espécies, inclusive o homem, causando diversas doenças. Nos suínos, a *P. multocida* está associada com rinite atrofica progressiva e como causa secundária em pneumonias. A pneumonia tem se mostrado uma doença de alto custo (3) e sob o ponto de vista econômico as doenças respiratórias representam um dos principais problemas nas granjas de suínos. Os prejuízos acarretados pelas mesmas são decorrentes não somente da mortalidade de animais, mas também no atraso no desenvolvimento, falta de uniformidade dos lotes, condenação de carcaças no frigorífico e gasto com medicamentos (1). Sendo que a pneumonia causada por *P. multocida* é a que causa maiores prejuízos econômicos à indústria suína (4). Vários autores têm registrado a presença de *P. multocida* em pulmões de suínos de diversos países (2). No Brasil, é cada vez maior o número de isolamentos de cepas dessa bactéria a partir de pulmões de suínos com pneumonia e pleurite (1). O presente trabalho objetivou isolar e caracterizar amostras de *P. multocida* de suínos com pneumonia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 172 amostras de parênquima pulmonar, sendo, 134 provenientes de 250 suínos necropsiados na Faculdade de Veterinária da UFRGS (em cinco etapas diferentes) e 38 amostras obtidas em frigorífico. Todas as amostras foram processadas em até 24 horas após a coleta. O material foi semeado simultaneamente em Agar Sangue Ovíno e Agar Mac Conkey e incubado em estufa bacteriológica por 48 horas a 37°C. As colônias suspeitas isoladas foram submetidas à coloração de Gram e provas bioquímicas (catalase, oxidase, citrato, meio de SIM e oxi-fermentação dos açúcares xilose, arabinose, maltose, trealose, sorbitol, manitol e dulcitol, utilizando indicador de Andrade). Também foi realizado a tipagem capsular através do teste da Hialuronidase e determinação da presença do gene *toxA* através de PCR.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 66 isolamentos de *P. multocida*, destes, 22 encontravam-se em cultivo misto e 44 de forma pura. Das 38 amostras provenientes dos animais coletados em frigorífico, obteve-se 24 (63,16%) isolados e das 134 amostras dos animais necropsiados, 42 (31,34%) isolados. A alta porcentagem de isolamento em animais de frigorífico pode ser devido ao menor uso de medicamento nestes animais, uma vez que os suínos necropsiados eram todos animais doentes e que podem ter recebido algum tipo de medicação. Quanto às características bioquímicas, todos os isolados apresentaram-se de maneira semelhante. Ocorrendo reação positiva para as provas da catalase e oxidase, resultado negativo ao citrato, demonstração de resultado positivo ao indol (apenas cinco amostras negativas), motilidade e H<sub>2</sub>S negativo no Meio de SIM. Quanto à oxi-fermentação de açúcares, todos os isolados demonstraram reação positiva ao Manitol e Sorbitol. Apenas dois resultados positivos para Trealose. Dos 66 isolados, 47 demonstraram possuir o perfil capsular do tipo A e os outros 19 isolados que não se enquadraram neste tipo capsular serão submetidos ao teste de aglutinação pela acriflavina neutra, visando determinar se pertencem ao tipo capsular D. Não foram detectados isolados portadores do gene *toxA*.

### CONCLUSÕES

O isolamento da *P. multocida* ocorreu em maior porcentagem em animais de frigorífico do que nos necropsiados. Ocorreu predomínio do perfil capsular do tipo A e não foram detectados isolados portadores do gene *toxA*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOROWSKI, S. M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil controle. In: **I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína**, Porto Alegre, 2006.
2. PIJOAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C.; LEMAN, A. D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n.º 5, p. 522-523, 1984.
3. PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: Lemman, A. (Eds) **Disease of Swine**. 8ª ed. Iowa; Iowa State University Press, p. 511-520, 1999.
4. ZHAO, G.; PIJOAN, C.; MURTAUGH, M. P. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. In: International Pig Veterinary Society Congress, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: International Pig Veterinary Society, p. 157, 1992.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABILLEIRA, F.S., MUSSKOPF, G., FAUTH, E.E., SILVA JR., V.B., SCARTEZZINI, M., VOGT F.I., IKUTA, N., FALLAVENA, L.C.B., RODRIGUES, N.C., OLIVEIRA, S.J. Análise Bacteriológica de Casos de Aderência Pulmonar em Carcaças de Suínos de Vários Lotes Abatidos em um Frigorífico no Rio Grande do Sul. 13º Congresso Brasileiro da ABRAVES, **Anais...** Florianópolis-SC, 2007
- AITKEN, L. A. & REEVE, J. L. Antimicrobial susceptibility testing for tilmicosin and various other antimicrobial agents against porcine pathogens. In: 15th International Pig Veterinary Congress, Birmingham, 1998. **Proceedings...** Birmingham, p.202, 1998.
- ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; MCNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 11, p.17-26. 1994.
- ALLAN GM., ELLIS J. Porcine circovirus: A review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. vol. 12. p 3-14, 2000.
- ALLEN, T. C. Hematoxylin and eosin. In: PROPHET, E B. et al. (Eds.). **Laboratory methods in histotechnology**. Washington D.C.: American Registry of Pathology. cap.9, p. 53-58, 1992.
- ARAÚJO, A. O. W.; Abscessos Pulmonares em Suínos Abatidos Industrialmente: Bacteriologia, Anatomopatologia e Relação Entre Portas de Entrada e Lesões Macroscópicas. Porto Alegre, Faculdade de Veterinária, 2004. 87 p. Dissertação de Mestrado, Conselho de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
- BAEKBO, P. Pathogenic properties of the *Pasteurella multocida* in the lungs of pigs. The significance of toxin production. In: International Pig Veterinary Society Congress, 10, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...**, Rio de Janeiro: International Pig Veterinary Society, p. 58, 1988.
- BARCELLOS, D. Controle da infecção pelo PCV2 no Brasil. I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína. **Anais**. Porto Alegre, p. 46-54, 2006.
- BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J.; SOBESTIANSKY, T. Uso de antimicrobianos. In: **Doenças dos Suínos** / editores, Jurij Sobestiansky, David Barcellos. – Goiânia: Cãnone Editorial, p. 685-717, 2007.
- BARCELLOS, D. E. S. N, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Comunicação pessoal**, 2008.
- BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria**. Third Edition, Cambridge University Press, 331 p., 1993.
- BAUER, A. M.; KIRBY, W. M. M. Antibiotic susceptibility by standartized single disc method. American Journal of Clinical Pathology. v. 45, p. 493-496, 1966.

BLACKALL, P. J.; PAHOFF, J. L.; BOWLES, R. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. **Veterinary Microbiology**, 57, 355-360, 1997.

BOROWSKI, S. M. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Fionamor. **Comunicação pessoal**, 2008.

BOROWSKI, S.; BARCELLOS, D.; MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. In: **Doenças dos Suínos** / editores, Jurij Sobestiansky, David Barcellos. – Goiânia: Cãnone Editorial, p. 177-181, 2007.

BOROWSKI, S. M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil controle. In: **I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína**, Porto Alegre, 2006.

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** 22 (3): 97-103, jul./set. 2002.

BOROWSKI, S. M., SILVA, S. C., SCHRANK, I. CARDOSO, M. Toxin detection in *Pasteurella multocida* strains isolated from swine lungs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**. 29(2):79-85. 2001

BOROWSKI, S. M. Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, Faculdade de Veterinária, 2001. 190p. Tese de Doutorado, Conselho de Pós-graduação, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2001.

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

BRAGA, C. A. S. B.; RESENDE, C. M. F.; PESTANA, A. C. N. R.; CARMO, L. S.; COSTA, J. E.; SILVA, L. A. F.; ASSIS, L. N.; LIMA, L. A.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, v35, n.º 2, p. 385-390, 2005.

CALSAMIGLIA, M., OLVERA, A., SEGALÉS, J., DOMINGO, M. Quantification of PCV2 in different routs of excretion: Possible transmission routs and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. **Proceedings of the 18th IPVS Congress**, Hamburg, Germany. vol.1.p.11, 2004.

CARTER, G. R.; RUNDELL, S. W. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **The Veterinary Record**, v. 87, p. 343, 1975.

CARTER, G. R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. **American Journal Veterinary Research**, v. 34, p. 293-294, 1973.

CASTRO, L. A. Dados não publicados, 2008.

CHAE, C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**. vol 168. p.41-49, 2004.

CHARALAMPOPOULOS, A.; APOSTOLAKIS, M.; TSIODRA, P. *Pasteurella multocida* pneumonia in an elderly non-immunocompromised man with a leg ulcer and exposure to cats. **European Journal of Internal Medicine**, 17, 380, 2006.

CHEN, H. I.; HULTEN, K.; CLARRIDGE III, J. E. Taxonomic Subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. **Journal of Clinical Microbiology**. vol. 40, n.º 9, p. 3438-3441, 2002.

DAVIES, 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 16S rRNA gene. **Microbiology**. 150, 4199-4210, 2004.

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**. 52, 59-67, 2003.

DRIEMEIER, D. Aspectos patológicos da infecção pelo PCV2 no Rio Grande do Sul. I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína. **Anais**. Porto Alegre, p. 34-45, 2006.

ELLISON, M. L. & CHAMPLIN, F. R. Outer membrane permeability for nonpolar antimicrobial agents underlies extreme susceptibility of *Pasteurella multocida* to the hydrophobic biocide triclosan. **Veterinary Microbiology** (2007), doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.038

FROST, A. J.; ADLER, B. *Pasteurella multocida*: the elusive determinants of virulence and immunity. **Veterinary Microbiology**, 72, 1-2, 2000.

FUSSING, V.; NIELSEN, J. P.; BISGAARD, M.; MEYLING, A. Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin-producing *Pasteurella multocida* *ssp. multocida* in Denmark. **Veterinary Microbiology**, 65, 61-74, 1999.

GUNTER, M.; KIPPER, S.; HENSEL, A. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage of live anaesthetized pigs. In: International Pig Veterinary Society, Lausanne – Switzerland, 1990, **Proceedings...** International Pig Veterinary Society, Lausanne – Switzerland, p109, 1990.

GERARDO, S. H.; CITRON, D. M.; CLAROS, M. C.; FERNANDES, H. T.; GOLDSTEIN, E. J. C. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and  $\alpha$ -glucosidase activity. **Journal of Clinical Microbiology** 39, 2558-2564, 2001.

- GILMOUR, N. J. L. Pasteurellosis in sheep. **The Veterinary Record**, 102, 100-102, 1978.
- HALLOY, D. J.; KIRSCHVINK, N. A.; MAINIL, J.; GUSTIN, P. G. Synergistic action of *E. coli* endotoxin and *Pasteurella multocida* type A for the induction of bronchopneumonia in pig. **The Veterinary Journal**. 169, 417-426, 2005.
- HARDING, J. C. S.; CLARK, E. G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (SMDS). **Swine Health and Production**. v. 5, n. 5, p. 201-203, 1997.
- HARDING, J. C.; CLARK, E. G.; STROKAPPE, J. H.; WILLSON, P.I.; ELLIS, J. A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical presentation. **Swine Health and Production**. v. 6, n., p. 249-254, 1998.
- HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS Microbiol Lett**, 265, 1-10, 2006.
- HASSLUNG, F.; WALLGREN, P.; LADEKJÆR-HANSEN, A.-S.; BØTNER, A.; NIELSEN, J.; WATTRANG, E.; ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; TIMMUSK, S.; BELÁK, K.; SEGALL, T.; MELIN, L.; BERG, M.; FOSSUM, C. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (SMDS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**. v. 106, n. 1-2, p. 49-60, 2005.
- HEIM, G.; COUTINHO, T. A.; ASANOME, W.; BARCELLOS, D. E. S. N. & BOROWSKI, S. M. Susceptibilidade antimicrobiana de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos à tilmicosina. In: IVII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre, 2006. **Anais...** Porto Alegre, p. 117, 2005.
- HOGEDAL, P. K.; VESTERGAARD NIELSEN; REEVE, J. L. & VRAA ANDERSEN, L. Clinical efficacy evaluations of the use of tilmicosin in drinking water for the treatment of bacterial and mycoplasmal pneumonia in pigs. In: 15th International Pig Veterinary Congress, Birmingham, 1998. **Proceedings...** Birmingham, p. 199, 1998.
- JACQUES, M. Adherence of *Pasteurella multocida* to porcine upper respiratory tract cells. **Current Microbiol**, 15, 115-119, 1987.
- 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.
- KALOREY, D.R.; YUVARAJ, S.; VANJARI, S. S.; GUNJAL, P. S.; DHANAWADE, B. S.; BHANDARKAR, A. G. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from na outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. (2007) doi: 10.1016/j.cimid.2007.06.003
- KASPAR, H. Results of the antimicrobial agent susceptibility study raised in a representative, cross-sectional monitoring study on a national basis. **International Journal of Medical Microbiology**, 296, S2, 69-79, 2006.

KEHRENBURG, C. & SCHWARZ, S. *dfrA20*, a novel trimethoprim resistance gene from *Pasteurella multocida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, jan, p. 414-417, 2004.

KEHRENBURG, C. & SCHWARZ, S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chlorthalidone in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. **FEMS Microbiology Letters**, 205, 283-290, 2001.

KEHRENBURG, C. & SCHWARZ, S. Identification of a truncated, but functionally active *tet(H)* tetracycline resistance gene in *Pasteurella aerogenes* and *Pasteurella multocida*. **FEMS Microbiology Letters**, 188, 191-195, 2000.

KICH, J.D.; NOGUEIRA, M.; MORES, N.; LOCATELLI, C.; TRIQUES, N.J.; KLEIN, C.S.; FELÍCIO, R.P. *Pasteurella Multocida* Tipo A como Agente Primário? Diagnóstico e Reprodução Experimental da Doença. 13º Congresso Brasileiro da ABRAVES, **Anais...** Florianópolis-SC, 2007

KIJIMA-TANAKA, M.; ISHIDA, K.; MORIOKA, A.; KOJIMA, A.; OHZONO, T.; OGIKUBO, T.; TAKAHASHI, T. & TAMURA, Y. A national surveillance of antibiotic resistance in *Escheria coli* isolated from food-producing animals in Japan. **Journal Antimicrobiol Chemotherapics**. 151, 447-451, 2003.

KIM, J., CHUNG, H.-K., CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal** 166, 251–256, 2003.

KITADAI, N.; MATSUMOTO, S.; NAKATA, K. & KATAE, H. *In vitro* combined effect of valnemulin with chlortetracycline against *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. In: 15th International Pig Veterinary Congress, Birmingham, 1998. **Proceedings...** Birmingham, p. 180, 1998.

KNOX, K. W.; BAIN, R. V. S. The antigens of *Pasteurella multocida* type I. **Immunology**, 3, 352-362, 1960.

LAINSON, F. A.; AITCHISON, K. D.; DONACHIE, W.; THOMSON, J. R. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropaty syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Feb. p. 588-593, 2002.

LICHTENSTEIGER, C. A.; STEENBERGEN, S. M.; LEE, R. M.; Polson, D. D.; VIMR, E. R. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, nº2, p. 3035-3039, 1996.

LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 protein of porcine circovirus tipe 3 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, p. 5065-5073. 2006.

MARKOWSKA, D. I. & TARASIUK, K. *In vitro* study of sensitivity of bacteria to linco-spectin. In: 15th International Pig Veterinary Congress, Birmingham, 1998. **Proceedings...** Birmingham, p. 190, 1998.

MOORKAMP, L.; NATHUES, H.; SPERGSER, J. TEGELER, R.; BEILAGE, E. G. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. **The veterinary Journal**, 175, 273-275, 2008.

MORES, M. A. Z. Anatomopatologia e Microbiologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de Carcaças em Suínos. Curitiba, Faculdade de veterinária, 2006. 77 p. Dissertação de mestrado, Conselho de Pós-Graduação, Universidade Federal do Paraná, 2006.

MORÉS, N. Epidemiologia da infecção pelo PCV2 em rebanhos do sul do Brasil. I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína. **Anais**. Porto Alegre, p. 27-33, 2006.

MORÉS, N.; RANGEL, L. F. S.; AMARAL, A. L.; ZANELLA, J. C.; ZANCANARO, M.; LIMA, G. M. M.; COLDEBELLA, A.; LIMA, E. S.; MIELE, M. Uso do plasma sangüíneo produzido em sistema de spray dry (PLASMA) na prevenção da circovirose suína. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35 (Supl.): s209-s219, 2007a.

MORÉS, N.; BARCELLOS, D.; ZANELLA, J. C. Circovirose suína. In: **Doenças dos Suínos** / editores, Jurij Sobestiansky, David Barcellos. – Goiânia: Cãnone Editorial, p. 213-225, 2007b.

MUTTERS, R.; IHM, P.; POHL, S.; FREDERIKSEN, W.; MANHEIM, W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposal for the new species *Pasteurella dogmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. **Int. Syst. Bacteriol**. 35, 309-322, 1985.

NAGAI, S.; SOMENO, S.; YAGIHASHI, T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. vol. 32, n.º 4, p. 1004-1010, 1994.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X., HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal Veterinarian Diagnostics Investigation** 19:591–615, 2007.

PANDIT, K. K.; SMITH, J. E. Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* Type A and its counterpart in Type D. **Research in Veterinary Science**, 54, 20-24, 1993.

PENSAERT, M. B., SANCHEZ JR., R.E., LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S., ALLAN, G. M., NAUWYNCH, H. J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**. vol.98. p.175-183. 2004.

PEREZ JR., A.A.; RISTOW, L.E.; MOSQUEIRA, P.D.; REIS, M.A.; FERREIRA, J.A.C. Comparação da Sensibilidade “In Vitro” de Amostras de Bactérias Frente a Clortetraciclina e Oxitetraciclina. 13º Congresso Brasileiro da ABRAVES, **Anais...** Florianópolis-SC, 2007

PESCADOR, C. E., BARCELLOS, D. E. Circovirose Suína. **Revista Suinocultura em Foco**. Ano 3, nº6, pag. 3, 2003.

PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: Leman, A. (Eds) **Disease of Swine**. 9<sup>a</sup> ed. Iowa; Iowa State University Press, p. 719-726, 2006.

PIJOAN, C.; TRIGO, E. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. **Canadian Journal of Veterinary Science**, 54, 516-521, 1989.

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

PRAPASARAKUL, N.; KLAKAI, P.; TAECHAKRIENGKRI, N.; VASUVAT, J.; SAE-UE, A.; NERAMITMANSOOK, W. & MAKHANON, M. *In vitro* sensitivity of porcine respiratory pathogens to tiamulin/amoxicillin combination. In: 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen, 2006. **Proceedings...** Copenhagen, volume 2, p. 445, 2006.

QUINTANA, J., SEGALÉS, J., ROSELL, C., CALSAMIGLIA, M., RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M., CHIANINI, F., FOLCH, J. M., MALDONADO, J., DOMINGO, M., CANAL, M., PLANA-DURÁN, J. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Veterinary Record**. vol 149. p.357-361, 2001.

REIS, R.; REIS, F. T.; SILVA, A. F.; CASTRO, A. L. & ISHIZUKA, M. H. Effect of florfenicol on piglet performance at a commercial pig farm in Brazil, and assessment of its *in vitro* efficacy against field respiratory pathogens. In: 16th International Pig Veterinary Congress, Melbourne, 2000. **Proceedings...** Melbourne, Australia, sept., p.127, 2000.

RIMLER, R. B. Presuntive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. **The Veterinary Record** 134, 191-192, 1994.

RIMLER, R. B.; RHOADES, K. R. *Pasteurella multocida* In: Adlam, C.; Rutter, J. M. ed. **Pasteurella and pasteurellosis**. London, Academic Press Limited, p. 37-73, 1989.

ROSS, R. F. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. **Animal Health Reviews** 7(1/2); 13-29, 2007.

ROSELL, C., SEGALÉS, J., PLANA-DURÁN, J., BALASCH, M., RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M., KENNEDY, S., ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., LATIMER, K. S., DOMINGO, M. Pathological and immunohistochemical and *in situ* hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Comparative Pathology**. vol 120. p.59-78, 1999.

SANCHEZ JR., R. E., NAUWYNCK, H. J., MCNEILLY, F., ALLAN, G. M., PENSAERT, M. B. Porcine circovirus-2 infection in swine fetuses inoculated at different stage of gestation. **Veterinary Microbiology**. vol.83. p.169-176, 2001.

SCHWARZ, S. & KEHRENBERG, C. Florfeicol susceptibility of porcine respiratory tract pathogens in Germany 2000-2005. In: 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen, 2006. **Proceedings...** Copenhagen, volume 2, p. 437, 2006.

SEGALÉS, J., ROSSEL, C., DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**. vol 98. p.137-149, 2004.

SEGALÉS, J., ALLAN, G. M. ; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**. V. 6, n. 2, p. 119-142, 2005.

SHIN, S. J.; KANG, S. G.; NABIN, R.; KANG, M. L. & YOO, H. S. Evolution of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria from bovine and porcine respiratory disease. **Veterinary Microbiology** 106, 73-77, 2005.

SMITH, D. G. E. Adherence and pathogenesis of *Pasteurella multocida* – a sticky problem. **The Veterinary Journal**, 159, 215-216, 2000.

SORDEN, S. D., HARMS, P. A., NAWAGITGUL, P., CAVANAUGH, D., PAUL, P. S. Development of a Polyclonal-antibody-based Immunohistochemical Method for the Detection of Type 2 Porcine Circovirus in Formalin-fixed, paraffin-embedded Tissue. **Journal of Veterinarian Diagnostics Investigation**. 11 (6): 528-530, 1999.

SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (SMDS). **Swine Health and Production**. v. 8, n. 3, p. 136, 2000.

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

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos / Walter Tavares**. Rio de Janeiro – Livraria Atheneu Editora – 2ª Reimpressão / 1ª Edição. 791 p. 1994.

THIRY, E. **Clinical Virology of Swine**. France. Les Éditions du Point vétérinaire, 185p, 2005.

TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Pathology**. vol 29. p.373-394, 2000.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**/Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke e Christine L. Case; Agnes Kiesling Casali... [et al.] – 6 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2000.

USLING, M. & BLAHA, T. Associations between pig herd management factors and antibiotic resistance. In: 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen, 2006. **Proceedings...** Copenhagen, volume 2, p. 452, 2006.

VALLÉ, M.; WOEHLÉ, F. & BOISRAMÉ, B. Seven-year survey of susceptibility to marbofloxacin of pathogenic Pasteurellacea strains isolated from respiratory pig infections. In: 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen, 2006. **Proceedings...** Copenhagen, volume 2, p. 459, 2006.

VERA LIZARAZO, Y. A.; FERRI, E. F. R.; MARTÍN, C. B. G. Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. **Research in Veterinary Science** (2008), doi: 10.1016/j.rvsc.2008.02.002

WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. **Internatinal Journal of Medical Microbiology** 296 S2, 81-86, 2006.

WEST, K. H., BYSTROM, J. B., WOJNAROWICZ, C., SHANTZ, N., JACOBSON, M., ALLAN, G. M., HAINES, D. M., CLARK, E. G., KRAKOWKA, S., MCNEILLY, F., KONOBY, C., MARTIN, K., ELLIS, J. A. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. vol.11. p.530-532, 1999.

WOLFF, T. Comparison of *in vitro* MIC values for various swine respiratory pathogens to chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC) for 2003-2006. In: 38th Annual Meeting Proceedings, Orlando, Florida **Proceedings...**, p. 275-278, 2007.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; ENDOH, Y. S. & KOJIMA, A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. **Journal Veterinary Medicine**. B 48, 555-560, 2001.

ZANELLA, J. R. C. Etiologia da síndrome multisistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) e papel do circovírus suíno tipo 2 (PCV2). I Simpósio UFRGS sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína. **Anais**. Porto Alegre, p. 23-26, 2006.

ZANELLA, J. R.C., MORES, N. Circovirose suína. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves, 2003. **Circular Técnica**. Disponível em <[http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/cit37.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cit37.pdf)> Acesso em: 29 de dezembro de 2006.

ZHAO, G.; PIJOAN, C.; MURTAUGH, M. P. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. In: International Pig Veterinary Society Congress, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: International Pig Veterinary Society, p. 157, 1992.

ZHOU, C.; LARA, C.; AMIGOT, J. A.; GONZÁLES, J.; GRUAS, C.; PEREZ, I.; BOLLO, J. M. & CALVO, E. Study of the susceptibility of *Pasteurella multocida* strains to florfenicol. In: 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen, 2006. **Proceedings...** Copenhagen, volume 2, p. 471, 2006.

ZIZLAVSKY, M.; CZANDERLOVA, L.; KELLNEROVA, D. & TYDLITAT, D. *In vitro* sensitivity of field strains of porcine respiratory pathogens to tulathromucin. In: 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen, 2006. **Proceedings...** Copenhagen, volume 2, p. 446, 2006