

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

PLEUROPNEUMONIA POR *Mannheimia haemolytica* EM CAPRINOS
ASSOCIADA AO ESTRESSE DE TRANSPORTE NO BRASIL

PAULA AUGUSTO TAUNDE

PORTO ALEGRE

2018

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

PLEUROPNEUMONIA POR *Mannheimia haemolytica* EM CAPRINOS
ASSOCIADA AO ESTRESSE DE TRANSPORTE NO BRASIL

PAULA AUGUSTO TAUNDE

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Patologia: Patobiologia Aplicada à Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Taunde, Paula Augusto

Pleuropneumonia por Mannheimia haemolytica em caprinos associada ao estresse de transporte no Brasil / Paula Augusto Taunde. -- 2018.

32 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Caprinos. 2. Estresse. 3. Doença respiratória. 4. Histopatologia. 5. Bacteriologia. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

PAULA AUGUSTO TAUNDE

PLEUROPNEUMONIA POR *Mannheimia haemolytica* EM CAPRINOS
ASSOCIADA AO ESTRESSE DE TRANSPORTE NO BRASIL

Aprovada em 13 de abril de 2018.

APROVADA POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros
Membro da Comissão

Profª. Dra. Luciana Sonne
Membro da Comissão

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini
Membro da Comissão

Dedico a minha dissertação aos pilares da minha vida: **meu Herói** Augusto Taunde, **minha Guerreira** Deonísia Mozene, **meu Guia** Figueiredo Artur Muinge e **minhas “Verdadeiras Bonecas”** (Mézbell e Kyara), por fazerem parte da minha vida.

Meu Paizão querido, apesar de não estares fisicamente do lado de cá, eu sinto a tua presença e acredito que acompanhas e torces pelo meu progresso de onde quer que estejas...

Saudades imensuráveis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e guiar os meus passos sempre.

Um especial e grandioso agradecimento aos meus pais Augusto Taunde *in memorium* e Deonísia Mozene, pela vida, saberes transmitidos e por me mostrarem a vida acadêmica no meio de extrema pobreza. **“Eles são a razão da minha existência, a luz que nunca se apagará na minha e o meu exemplo de vida sempre”**, muitíssimo obrigada por tudo!

Ao meu amado esposo Figueiredo Artur Muinge (carinhosamente meu Bebezão), pessoa presente, maravilhosa, atenciosa e acima de tudo verdadeira. Agradeço de coração pelo apoio e amor incondicional. Sem o teu suporte, não chegaria onde estou. Agradeço ao universo por te colocar na minha vida e a Deus por proteger a nossa união sempre. Serei eternamente grata a Ti por tudo e mais, meu Amor...

Às minhas "Bonecas", Mézbell da Paula Figueiredo Muinge, (minha Bebezinha) e Kyara Figueiredo Muinge, (meu Pinguim-bebé), pelos momentos de alegria, colaboração e por suportarem os momentos de ausência em prol do vosso bem-estar. Por estas duas Pequenas, vivo e aceito qualquer desafio! Mamãe vos ama muito.

Aos meus sobrinhos “Tau”, Tony, Quina, Diny, Hida, Sandia, Dodo, Guto, Nassy, Judy, Viví, Beny, Bié, Elby, Kwame, Gugu, Fely, Ezek, Tasne, Cadys, Laian, “Hazi”, Zua e Dio pelos momentos de alegria e diversão.

Agradeço ao meu orientador Professor David Driemeier, pela oportunidade de formação, pelos bons encaminhamentos e ensinamento que serão úteis não só na área acadêmica, mas também na vida.

A grande família SPV-UFRGS: os professores (David, Luciana e Saulo), pelos ensinamentos e apoio moral; os pós-graduandos, os técnicos, estagiários curriculares, estagiários extracurriculares, pelos bons momentos de convivência, apoio e ajuda prestada desde a minha estadia no Brasil, durante a formação e na elaboração do trabalho.

A comunidade moçambicana em especial ao casal Inroga, pela amizade, e suporte nesta longa caminhada na diáspora.

Ao colega Cláudio Laisse pela amizade, ajuda prestada antes e durante estadia em Porto Alegre, e pelo devido encaminhamento, vai o meu muitíssimo obrigado.

Aos proprietários dos caprinos, por terem disponibilizado os animais para a realização do estudo, agradeço.

Aos pais dos moçambicanos no Brasil (família Cláudio) pelos momentos de convívio, apoio incondicional, suporte e verdadeira amizade, por tudo o meu muito obrigado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste sonho, vai o meu muito obrigado!

RESUMO

A pleuropneumonia por *Mannheimia haemolytica* é uma enfermidade com elevada morbidade e mortalidade de ruminantes de todas as idades. O objetivo desse estudo é descrever os aspectos epidemiológicos, patológicos, bacteriológicos e moleculares de pleuropneumonia em caprinos transportados da região Nordeste para a região sul do Brasil. Quarenta caprinos (seis meses a quatro anos de idade) vieram a óbito em dois períodos: durante o transporte e dois a três dias após o desembarque. Os sinais clínicos observados incluíam dispneia, secreção nasal mucopurulenta e tosse. Estes caprinos foram submetidos ao exame de necropsia, na qual foram colhidos múltiplos fragmentos de órgãos para análise histopatológica, bacteriológica e molecular. Macroscopicamente, todos os caprinos apresentaram áreas de consolidação pulmonar, predominantemente da região cranioventral, associadas à deposição de grande quantidade de fibrina, com espessamento e aderência pleural em 90% (36/40) dos casos, além de hidrotórax em 37,5% (15/40) dos casos. Histologicamente, as lesões em todos os caprinos eram constituídas por pleuropneumonia fibrinossupurativa, caracterizada por infiltrado inflamatório difuso acentuado de neutrófilos em pleura, alvéolos, brônquios e bronquíolos, associado à deposição difusa acentuada de fibrina, bem como edema alveolar. Através do exame bacteriológico, foram isoladas bactérias do gênero *Mannheimia* em todos os casos. Foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) para o gene 16S rDNA de *Mannheimia* spp., na qual 26 amostras resultaram positivas. Através do sequenciamento molecular, obteve-se 98% de identidade para o gene 16S rDNA e 98% de semelhança com *Mannheimia haemolytica* em todos isolados. *M. haemolytica* é a principal bactéria causadora de pleuropneumonia em caprinos submetidos ao estresse.

Palavras chave: Caprinos. Estresse. Doença respiratória. Histopatologia. Bacteriologia.

ABSTRACT

Pleuropneumonia by Mannheimia haemolytica is a disease that causes high morbidity and mortality in ruminants of all ages. This study describes the epidemiological, pathological, bacteriological and molecular features of pleuropneumonia in goats transported from the Northeast region to Southern Brazil. Forty goats (six months-old to four years-old) died in two periods: during transportation and two or three days after unloading. Clinical signs included dyspnea, mucopurulent nasal discharge and cough. These goats were necropsied and multiple organ fragments were collected for histopathological, bacteriological and molecular analysis. Grossly, all goats had pulmonary consolidation, predominantly affecting the cranioventral lung region, associated to a severe fibrin deposition, with pleural thickening and pleural adhesion in 90% (36/40) of the cases and hydrothorax in 37.5% (15/40) of the cases. Histologically, lesions in all goats were composed by a fibrinosuppurative pleuropneumonia, characterized by a diffuse inflammatory infiltration of neutrophils involving the pleura, alveoli, bronchi and bronchioli, associated with a severe fibrin deposition and alveolar edema. Mannheimia genus bacteria were isolated in all cases. The polymerase chain reaction (PCR) for the 16S rDNA gene of Mannheimia spp. was performed in 26 samples, and a positive result was obtained. Through molecular sequencing an identity of 98% for the 16 rDNA gene and 98% resemblance to Mannheimia haemolytica in all isolates were observed. M. haemolytica is the main bacteria causing pleuropneumonia in goats subjected to stress.

Keywords: Goats. Stress. Respiratory disease. Histopathology. Bacteriology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1	Etiologia.....	10
2.2	Patogênese.....	10
2.3	Epidemiologia.....	10
2.4	Sinais clínicos e patologia.....	11
2.5	Diagnóstico e tratamento.....	12
3	ARTIGO.....	14
4	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura tem se destacado no agronegócio brasileiro, com um efetivo estimado de 9,61 milhões de caprinos distribuídos irregularmente em estabelecimentos agropecuários. A região Nordeste detém o maior efetivo a nível nacional, com cerca de 92,7% (IBGE, 2015) seguida da região sul com um efetivo estimado de 333.314 caprinos, equivalente a 3,6% do efetivo total (IBGE, 2013). A caprinocultura é uma atividade praticada em todo mundo, fortalece a agricultura familiar através da geração de renda e emprego (RAHAL *et al.*, 2014; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014). Os caprinos apresentam inúmeras qualidades, como, por exemplo, a elevada adaptabilidade aos diferentes ecossistemas, a precocidade das fêmeas, além de serem fonte de proteína animal (carne e leite) e couro de alta qualidade (RICHARDSON *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2008; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014).

O manejo sanitário dispensado a esses animais normalmente é insuficiente e inadequado, com pouca importância nos aspectos nutricionais, sanitários e reprodutivos (SANTOS, 2004). Altos índices de mortalidade são observados e advêm de falhas de manejo, principalmente sanitário (ROSA *et al.*, 2013). Das doenças infecciosas que afetam os caprinos, as pneumonias são uma das causas mais comuns em todo mundo (ACKERMANN; BROGDEN, 2000; EMIKPE *et al.*, 2010) e ocorrem como resultado da associação entre fatores relacionados ao ambiente, ao manejo, ao hospedeiro e aos agentes infecciosos (bacterianos, fúngicos, virais e/ou parasitários) (MINKA; AYO, 2009; MAHU *et al.*, 2015). Os agentes bacterianos constituem a classe mais frequente e *Mannheimia haemolytica* é o principal agente isolado em casos de pneumonia em caprinos, principalmente quando submetidos ao estresse (EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014; PONNUSAMY *et al.*, 2017).

Pneumonia associada ao estresse de transporte é comumente descrita em ruminantes de todas as idades, devido à elevada morbidade e mortalidade de animais, contudo os efeitos de más condições de transporte são pouco conhecidos pelos criadores, o que leva à falta de adoção de boas práticas de transporte, e consequentemente redução da imunidade e colonização pulmonar por agentes oportunistas. Com isto, o presente estudo objetivou descrever os aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos, bacteriológicos e moleculares de pleuropneumonia por *Mannheimia haemolytica* em 40 caprinos associada ao estresse do transporte.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia

Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, é uma bactéria gram-negativa, cocobacilar, pertencente ao Filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Pasteurellales, família Pasteurellaceae e gênero *Mannheimia* (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; MERKEY *et al.*, 2013). A bactéria varia de 1 - 2 µm X 0,3 – 0,6 µm, é anaeróbia facultativa, possui cápsula, causa hemólise em Ágar sangue, fermenta açúcares, não produz esporos e é imóvel. Em Ágar MacConkey forma colônias pequenas, individuais e rosadas (FETT *et al.*, 2008; MERKEY *et al.*, 2013; TAHAMTAN; MIRGHAFARI, 2015). Essa bactéria cresce bem em meios enriquecidos, embora possa crescer também em meios não enriquecidos (MERKEY *et al.*, 2013).

A bactéria é comensal das tonsilas e nasofaringe dos animais e humanos (MERKEY *et al.*, 2013) tornando-se infectante quando estes são submetidos a imunossupressão (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014; EMIKPE *et al.*, 2015). Há 12 sorotipos de *Mannheimia haemolytica* (A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 e A17) (MERKEY *et al.*, 2013; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014), todos responsáveis pela doença em animais de todas as idades na presença de fatores estressantes (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011). Fora do hospedeiro a bactéria sobrevive apenas em temperaturas quentes e umidade elevada (KAUD *et al.*, 2011).

2.2 Patogênese

A bactéria é comensal das vias respiratórias superiores e torna-se patogênica na presença de fatores predisponentes, dentre eles agentes virais (Parainfluenza-3, Herpesvírus 1, Vírus Sincicial Respiratório Bovino), agentes bacterianos (*Pasteurella multocida*, *Mycoplasma spp.*, *Trueperella pyogenes*), fatores ambientais (MINKA; AYO *et al.*, 2009; MOMIN *et al.*, 2011; MERKEY *et al.*, 2013), bem como fatores relacionados ao hospedeiro e manejo (YENER *et al.*, 2009; MERKEY *et al.*, 2013; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014). A partir do momento em que a bactéria torna-se

patogênica ocorre replicação exponencial da mesma, resistência aos mecanismos de defesa, adesão ao epitélio respiratório e colonização dos pulmões (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

O período de incubação depende da idade do animal, estado imunitário, infecções concomitantes, além da dose infectante e virulência do agente, contudo, geralmente, em infecções naturais o período de incubação é de três a cinco dias e em infecções experimentais varia de seis a doze horas (RICE *et al.*, 2008). A disseminação da doença ocorre por inalação de aerossóis expelidos pelos animais acometidos (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005) ou pela ingestão de material contaminado pelas secreções (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

Vários fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da doença. Dentre eles o lipopolissacarídeo e a leucotoxina, responsáveis por apoptose das células imunitárias, principalmente dos macrófagos e na indução da liberação dos mediadores da inflamação, além de hemorragia, necrose e trombose (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011; PONNUSAMY *et al.*, 2017); a cápsula, que garante a capacidade antifagocitária da bactéria, a aderência e a invasão da mesma; as proteínas externas de membrana que interagem com o sistema de complemento, auxiliam na aderência, colonização e na invasão da bactéria (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; FETT *et al.*, 2008; PONNUSAMY *et al.*, 2017). A neuraminidase que induz a redução da viscosidade do muco (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

2.3 Epidemiologia

As doenças respiratórias em ruminantes constituem uma das principais causas de perdas econômicas, tanto em produção extensiva como intensiva (ALEXANDER *et al.*, 2008, YENER *et al.*, 2009). A pleuropneumonia acomete ruminantes em todo o mundo, afeta animais de todas as idades, e causa baixa produtividade devido à baixa conversão alimentar, custos com tratamento, redução da viabilidade e elevada mortalidade (ACKERMANN; BROGNEN, 2000; ABDULLAH *et al.*, 2014). A ocorrência da doença está geralmente associada a presença fatores estressantes (ALEXANDER *et al.*, 2008; YENER *et al.*, 2009). O estresse e a imunossupressão podem estar relacionados ao transporte, manejo deficiente, elevada umidade do ar, ventilação deficiente, verminoses pulmonares, superlotação e mudanças bruscas do ambiente (FETT *et al.*,

2008). Infecção por *Mannheimia haemolytica* já foi reportada em vários países e a bactéria isolada tanto em animais sadios (POULSEN *et al.*, 2006; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014) como em animais doentes (AHMED; MOHAMDED; KHALAF, 2017; MAHU *et al.*, 2015; PONNUSAMY *et al.*, 2017). Em estudos retrospectivos feitos em caprinos com pneumonia na Turquia, a bactéria foi isolada em 81,8% (18/22) (VIANA *et al.*, 2007), enquanto que na Noruega, o agente foi isolado da cavidade nasal de ovinos aparentemente sadios em 41 % (57/139) dos casos (POULSEN *et al.*, 2006).

2.4 Sinais clínicos e patologia

Os sinais clínicos observados dependem dos fatores envolvidos na patogenicidade da doença. Geralmente, os sinais clínicos são de evolução rápida e culmina frequentemente com morte dos animais. Quando observados incluem febre (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011; TAJIK; NAZIFI; ESHTRAKI, 2016), apatia, descarga oculonasal bilateral serosa que evolui para mucopurulenta, dispneia, anorexia e tosse (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011; EKONG; AKANBI; ODUGBO, 2014). Sibilos respiratórios estão presentes e a mortalidade excede os 10%. Os animais que sobrevivem geralmente desenvolvem a forma crônica e apresentam baixo desenvolvimento, além da baixa conversão alimentar (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; RICE *et al.*, 2008).

Macroscopicamente observa-se áreas de consolidação pulmonar, principalmente, na região cranioventral (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; YENER *et al.*, 2009; ABDULLAH *et al.*, 2014), frequentemente com distribuição anteroventral (TAJIK; NAZIFI; ESHTRAKI, 2016). Estas áreas são delimitadas, de aspecto hemorrágico, consistência firme (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005), com material fibrilar, além de distensão dos septos interlobulares. A superfície de corte apresenta um padrão marmorizado com focos multifocais irregulares pálidos (necrose) delimitados por parênquima remanescente (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011). Ocorre ainda oclusão das vias aéreas por exsudado fibrinoso (RICE *et al.*, 2008), além de obstrução dos vasos sanguíneos por trombos (RICE *et al.*, 2008; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

Na histologia, em vias respiratórias, na pleura e em alvéolos observa-se infiltrado inflamatório predominante neutrofílico, que em muitos casos, apresentam-se degenerados e possuem formato alongado. Esses são denominados células em “grão de

aveia”. Associado ao infiltrado inflamatório, há deposição de fibrina, edema intersticial, trombose e dilatação dos vasos linfáticos (RICE *et al.*, 2008; ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005). Ocasionalmente, necrose e descamação do epitélio bronquial são observadas (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2004). Dependendo do estágio da doença e da patogenicidade da mesma, pode resultar em broncopneumonia necrotizante (SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011), broncopneumonia supurativa, pleuropneumonia fibrinosa ou pleuropneumonia fibrinossupurativa (ADBULLAH *et al.*, 2014).

2.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico presuntivo da doença é feito baseado no histórico, sinais clínicos e achados anatomopatológicos, contudo o isolamento bacteriológico e detecção molecular do agente são cruciais para o alcance do diagnóstico definitivo da doença (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; PONNUSAMY *et al.*, 2017). Devido à elevada sensibilidade e especificidade que a técnica molecular apresenta, este é recomendado no diagnóstico da doença. (PONNUSAMY *et al.*, 2017).

O tratamento da doença é feito através do uso de antibióticos com objetivo de eliminar o agente e evitar a ocorrência de infecções secundárias. Vários antibióticos são usados dentre eles a ampicilina, penicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, tilosina, florfenicol ceftiofur, cetriaxona, amicacina e enrofloxacina (PONNUSAMY *et al.*, 2017). O uso indiscriminado de antibióticos favoreceu a ocorrência de resistência da bactéria para os beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas e aminoglicosídeos (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005).

Medidas de prevenção da doença incluem a melhoria das instalações, manejo sanitário, biosseguridade, limitação da mistura de animais de diferentes origens, minimização dos fatores estressantes, quarentena dos animais novos (ZECCHINON; FETT; DESMECHT, 2005; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011), administração de minerais e vitaminas (Cobre, Selênio e Zinco e Vitamina E), além de fornecimento de água e alimento de boa qualidade (MAHU *et al.*, 2015). Um estudo feito na Malásia, mostrou que o uso de vacinas inativadas em caprinos a partir dos 6 meses de idade, pode reduzir a incidência e a mortalidade de animais (SABRI; SHAHRON-SALISI; EMIKPE, 2013). No diagnóstico diferencial, todas outras doenças pulmonares são incluídas tanto as de causa bacteriana, viral, fúngicas assim como as de origem

parasitárias (ACKERMANN; BROGNEN, 2000; YENER *et al.*, 2009; SINGH; RITCHEY; CONFER, 2011).

3 ARTIGO

Neste item é apresentado o artigo intitulado **“Pleuropneumonia por *Mannheimia haemolytica* em caprinos associada ao estresse de transporte no Brasil”** o qual foi redigido segundo as normas da revista *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (JVDI) a ser submetido em breve.

**Pleuropneumonia por *Mannheimia haemolytica* em caprinos associada ao estresse
de transporte no Brasil**

Paula Augusto Taunde¹, Fernando Froner Argenta, Ronaldo Michel Bianchi, Bianca Santana Cecco, Andreia Vielmo, Bruna Corrêa Lopes, Franciele M. Siqueira, Caroline P. de Andrade, Gustavo G. M. Snel, Luciana Sonne, Saulo P. Pavarini, David Driemeier

Department of Veterinary Pathology (Taunde, Argenta, Bianchi, Cecco, Vielmo, Lopes, Siqueira, Andrade, Snel, Sonne, Pavarini and Driemeier), School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

¹Corresponding author: Paula A. Taunde, Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 91540-000. paulataunde@gmail.com

Short running title: Caprine bacterial pleuropneumonia.

Resumo: Descreve-se os aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos, bacteriológicos e moleculares de pleuropneumonia por *Mannheimia haemolytica* em caprinos após transporte prolongado no Brasil. Quarenta caprinos vieram a óbito durante a viagem e dois a três dias após o desembarque, apresentando sinais clínicos de dispneia, secreção nasal e tosse. Estes foram submetidos à necropsia, para coleta de fragmentos de órgãos e realização de exames histopatológico, bacteriológico e molecular. Macroscopicamente, todos os caprinos apresentaram diferentes graus de consolidação pulmonar, afetando predominantemente a região cranioventral, associada à deposição acentuada de fibrina, com espessamento e aderência pleural em 90% (36/40) dos casos. Histologicamente observaram-se lesões de pleuropneumonia fibrinossupurativa em todos os caprinos, caracterizadas por infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico em brônquios, bronquíolos, alvéolos e em pleura. Na bacteriologia foram isoladas, em todos os casos, bactérias do gênero *Mannheimia*, predominantemente não hemolíticas em Ágar sangue. Pela PCR realizada em 26 amostras identificou-se *Mannheimia* spp. em todas as amostras e através do sequenciamento completo do gene 16S rDNA foi identificada a espécie com 98% de identidade para *Mannheimia haemolytica*. A associação dos achados observados neste estudo permitiu o diagnóstico de pleuropneumonia em caprinos por colônias de *Mannheimia haemolytica* não hemolíticas associada ao estresse do transporte.

Palavras-chave: caprinos, doenças respiratórias, histopatologia, *Mannheimia haemolytica*, PCR.

As infecções respiratórias constituem uma das principais causas de morte de caprinos e resultam da associação de vários fatores, que incluem agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários, além daqueles relacionados ao ambiente, ao manejo e ao hospedeiro.^{6,7,13} Os agentes bacterianos constituem a principal classe causadora de pneumonias em caprinos. *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) é um dos principais agentes oportunistas causadores de pleuropneumonias em ruminantes, principalmente em bovinos e menos comumente em caprinos, quando estes são submetidos a condições estressantes, como o transporte.^{7,9,11}

A pleuropneumonia por *M. haemolytica* pode afetar ruminantes de todas as idades com alta morbidade e mortalidade.^{2,9} A doença causa prejuízos não só pela morte de animais, mas também pelo elevado custo com tratamento, manejo dos animais doentes, redução no ganho de peso, condenação de carcaças e menor produção de leite e carne.^{3,7} O diagnóstico da *M. haemolytica* pode ser feito através do histórico, sinais clínicos, achados patológicos, isolamento do agente e testes moleculares.^{1,2,9,10} Este trabalho objetivou descrever os aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos, bacteriológicos e moleculares de 40 casos de pleuropneumonia por *Mannheimia haemolytica* ocorridos em caprinos submetidos ao estresse de transporte.

Quarenta caprinos, pertencentes a dois revendedores foram encaminhados para realização de necropsia durante o período de junho de 2016 a dezembro de 2017. Durante a necropsia, fragmentos de diversos órgãos foram coletados e fixados em formol a 10%, processados rotineiramente, e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). Também foram refrigeradas amostras de pulmão de todos os caprinos para realização de exames bacteriológicos. O exame molecular foi feito a partir dos isolados bacterianos, seguida de sequenciamento completo do gene 16S rDNA. Também foram

realizadas visitas às propriedades para coleta de dados epidemiológicos e avaliação dos animais.

O isolamento bacteriológico foi feito em Ágar sangue ovino 5% e em Ágar MacConkey, incubadas em atmosfera enriquecida de CO₂ (~5%) a 37°C por 72 horas, e as colônias bacterianas isoladas, identificadas pelas suas características culturais, morfotintoriais e bioquímicas de acordo com as orientações descritas.⁵

Vinte e seis amostras dos cultivos bacteriológicos foram submetidas à técnica de PCR. Primeiramente, o DNA total de colônias isoladas foi extraído através do Kit QIAmp DNA (Qiagen). A técnica de PCR foi projetada para a amplificação parcial do gene 16S rDNA de *Mannheimias* spp. (primer forward: 5'-TCACCAAGCCGTCGATCTCT-3' e primer reverse: 5'-TTCGCACATGAGCGTCAGTAC-3), a qual resulta em uma ampliação de 499bp. A reação de PCRs incluiu 1 U Taq Platinum (Invitrogen), 10X de tampão Taq, 15 pmol de cada primer, 200nM de cada dioxidonucleotídeos (dNTP), 1.5 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA previamente extraído em um final volume de 25 µL. As reações foram padronizadas no equipamento ABI Veriti Thermal Cycler, com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 min seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 59°C por 45 s e 72°C por 30 s, e um ciclo final de 72°C por 10 min. A espécie *Mannheimia haemolytica* foi determinada pela amplificação completa do gene 16S rDNA usando primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). O controle negativo foi realizado em paralelo, na ausência de DNA genômico. O amplicom de 1.450 pb foi precipitado por RNA de transferência (tRNA) (InvitrogenTM, São Paulo, Brazil) e sequenciado no equipamento ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). As sequências geradas com Phred

score de 30 foi examinado na busca de similaridades com sequências conhecidas e depositadas no BlastN (NCBI database).

Os caprinos eram mantidos em instalações com ventilação deficiente, higiene precária e em alta lotação. Não havia segregação por origem, faixa etária, sexo ou isolamento dos animais doentes. Na avaliação clínica dos caprinos, estes exibiam má condição corporal, apatia, anorexia, dispneia, secreção nasal bilateral mucopurulenta (Fig. 1A) e fezes pastosas no períneo. Conforme os proprietários, os caprinos eram adquiridos no Nordeste (estado de Pernambuco e Bahia), aglomerados e transportados em ambiente fechado (caminhões cobertos de lona), em lotes que variavam de 300 a 700 caprinos por carga. A viagem durava em média quatro a cinco dias, com escassez de alimento e água. Durante o desembarque parte dos caprinos estavam mortos e outros se apresentavam apáticos, por vezes com tosse, dificuldade respiratória e vinham ao óbito dois a três dias. Segundo os proprietários, nenhum tratamento farmacológico foi realizado aos caprinos previamente a viagem.

À necropsia, 70% (28/40) dos animais eram machos e 30% (12/40) fêmeas, com idade entre seis meses a quatro anos. Ao exame externo constatou-se condição corporal regular a ruim, desidratação, palidez das mucosas e diferentes graus de secreção nasal bilateral mucopurulenta. Ao exame interno todos os caprinos apresentavam pulmões não colabados, com aspecto brilhante e diferentes graus de consolidação, principalmente, em regiões cranioventrais, associadas frequentemente por deposição de fibrina (Fig. 1B e 1C). Estas áreas eram vermelho-escuras e firmes. Em 90% (36/40) dos casos, além da consolidação observou-se aderência da pleura visceral à parede costal, além de líquido de aspecto gelatinoso no tórax (hidrotórax) em 37,5% (15/40) dos casos. Observou-se também grande quantidade de conteúdo espumoso na traqueia e nos grandes brônquios. Além das lesões pulmonares, 20% (8/40) dos caprinos

apresentavam no abomaso, quantidades variadas de parasitas morfológicamente compatíveis com *Haemonchus contortus*.

Na histologia foram observadas lesões compatíveis com pleuropneumonia fibrinossupurativa, caracterizada por acentuado infiltrado inflamatório multifocal a coalescente, localizado na pleura, no interior de alvéolos, brônquios e bronquíolos, associado à necrose acentuada do epitélio bronquiolar e bronquial (Fig. 1D). Sobre a pleura, além do infiltrado inflamatório, apresentava-se acentuadamente espessada com grande quantidade de fibrina (Fig. 1E). O infiltrado era composto predominantemente por neutrófilos íntegros e degenerados, por vezes, apresentando núcleo alongado (células em grão de aveia), além de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, associado à acentuada deposição fibrina e detritos celulares. Observou-se ainda acentuado edema intra-alveolar e de septos interlobulares.

Na análise bacteriológica dos pulmões, em 100% dos casos, foram isoladas colônias puras do gênero *Mannheimia*, dos quais 15% (6/40) eram hemolíticas e 85% (34/40) não hemolíticas (Fig. 1F). Adicionalmente, os isolados foram positivos para hidrólise da Esculina, negativos para ONPG Beta-galactosidase e não cresceram em Ágar MacConckey.

A reação de PCR foi positiva em 100% dos casos submetidos (26 casos) à técnica, com identificação do gene 16S DNA ribossomal para *Mannheimia* spp. Posteriormente, *Mannheimia haemolytica* foi confirmada pelo sequenciamento completo do gene 16S rDNA com 98% de identidade em todas as amostras analisadas.

A caprinocultura é afetada negativamente por diversas enfermidades e as doenças pulmonares são muito frequentes e culminam com baixa viabilidade, elevada mortalidade,^{2,3,13} além de altos custos com tratamento.^{4,13} Os agentes bacterianos constituem os principais causadores de pneumonia em caprinos e *M. haemolytica* a

bactéria mais isolada de lesões pulmonares, tanto em neonatos, como em jovens e adultos, principalmente na presença de fatores estressantes, como o transporte.^{3,7,13}

O transporte de caprinos vivos é comum na caprinocultura,¹² o que leva a movimentação de criadores e/ou revendedores de uma região para outra, para aquisição destes animais. Contudo, quando realizado sem a adoção de medidas adequadas para o bem-estar animal, culmina com mortalidade dos mesmos por doenças respiratórias, sendo denominada de “febre dos transportes”,^{6,11,13} fato que foi demonstrado nos caprinos em estudo. Estes foram mantidos e transportados em ambiente fechado dos caminhões com baixa qualidade de ar e aglomerados de caprinos de diferentes origens, o que favoreceu a ocorrência da doença. O quadro clínico foi agravado também pela falta de alimento, água e longo percurso de viagem. Pneumonia secundária ao transporte envolvendo *M. haemolytica* é comumente descrita em ruminantes.^{1,2,11,13}

A principal forma de disseminação da doença é por inalação dos aerossóis através do contato focinho-focinho ou por ingestão de alimentos contaminados¹³ o que justifica maior ocorrência da doença nestes caprinos, devido a miscigenação de animais de diferentes origens em ambiente fechado, com deficiente ventilação e humidade elevada, fatores estes que favoreceram a sobrevivência e viabilidade da bactéria. Não obstante, a superlotação em caminhões bem como nas granjas, favoreceram uma maior transmissão do agente, manutenção da infecção, e conseqüentemente elevada morbidade e mortalidade durante o transporte e após o desembarque dos animais.

As condições climáticas apresentam grande influência na ocorrência da doença, por garantirem a sobrevivência e viabilidade dos micro-organismos.⁹ A região de partida e de chegada dos caprinos apresentam climas distintos, que resultou numa seqüência de eventos desde a alteração do microambiente respiratório, irritação das vias aéreas superiores, redução da atividade mucociliar e fragilidade da imunidade inata,

consequente adesão e colonização dos pulmões pela bactéria.^{9,13,14} Em conjunto, o manejo deficiente, a condição corporal ruim, além do endoparasitismo, podem ter potencializado a infecção e agravado o quadro clínico.

A principal característica da *M. haemolytica* é causar hemólise em Ágar sangue, além de crescer em Ágar MacConkey, Beta-galactosidase positiva e ser negativa para hidrólise da Esculina,^{6,9,11} características contrárias das observadas na maioria de nossos isolados. Colônias bacterianas não hemolíticas por deleção do gene da hemolisina foram observadas em um terneiro com pleuropneumonia e septicemia, contudo as demais características típicas da espécie bacteriana foram preservadas.⁸ Colônias também não hemoíticas foram isoladas em ovinos e foi associada ao processamento imediato das amostras.¹⁴

A presença ou não do gene da hemolisina não foi avaliada em nosso estudo. Contudo, acredita-se que animais extremamente imunodeprimidos podem abrigar colônias não hemolíticas e, na presença de fatores estressantes, tornarem-se potenciais patógenos.¹⁴ A condição corporal ruim que os caprinos apresentaram e o nível nutricional deficiente, aliada aos dias de viagem em jejum podem ter favorecido para a ocorrência da imunodepressão acentuada dos caprinos e conseqüentemente maior susceptibilidade para este grupo de patógeno.

Vários fatores podem interferir na variação fenotípica dos micro-organismos, desde fatores ambientais,^{9,13} inibição enzimática por fármacos, além de particularidades do sorotipo envolvido¹⁰ e manuseio das amostras.¹⁴ Apesar dos proprietários garantirem que os caprinos não foram medicados previamente à viagem, não se descarta possível tratamento em seus locais de origem e conseqüentemente inibição enzimática de origem farmacológica, que foi evidenciada pela perda de algumas propriedades fenotípicas da bactéria.

Embora os resultados bacteriológicos tenham evidenciado diferentes características fenotípicas na grande maioria dos isolados, em 100% das 26 amostras submetidas à análise molecular, o resultado foi positivo para *Mannheimia haemolytica*, possivelmente, indicando que o genótipo bacteriano foi preservado e apenas o seu fenótipo foi alterado. Elevada sensibilidade e especificidade do teste também foi observada em estudos com isolamento da espécie bacteriana não hemolítica.^{8,14} Devido à elevada sensibilidade e especificidade que o teste molecular apresenta, ele é recomendado para identificação do agente e no diagnóstico definitivo da pneumonia por *Mannheimia haemolytica*.

Fatores estressantes podem desenvolver pleuropneumonia bacteriana em caprinos e colônias de *M. haemolytica* não hemolíticas também podem gerar a doença.

Declaração de conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses com relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

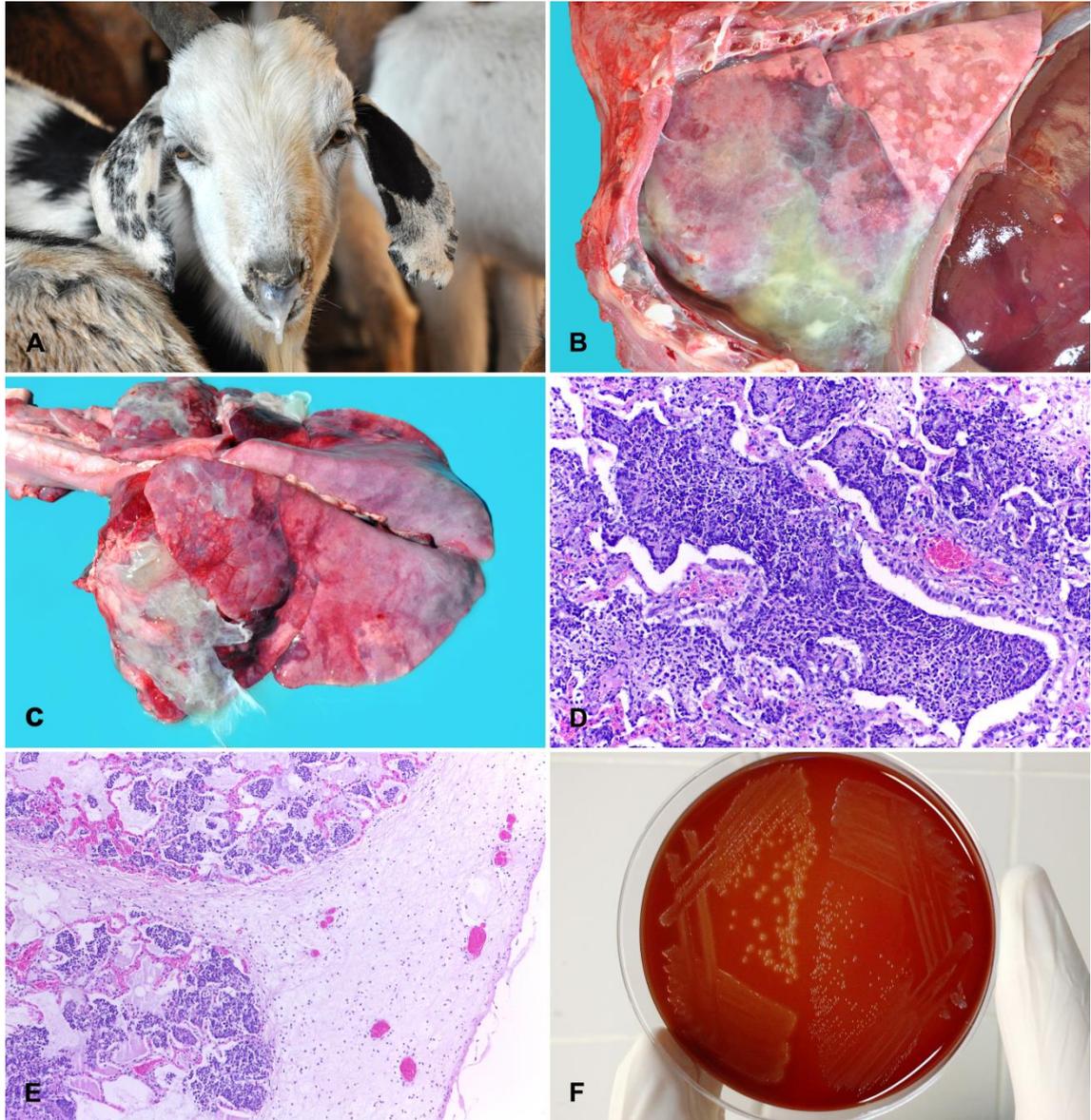
Fundos

Agradecemos ao Instituto de Bolsas de Estudo (IBE) da República de Moçambique, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências

1. Ahmed WA, et al. Molecular and phenotypical characterization of *Mannheimia haemolytica*. Isolated from goats in Baghdad Province. *Advances in Microbiology* 2017;7:304-314.
2. Ekong PS, et al. Case report of respiratory manheimiosis in sheep and goat complicated by *Bordetella parapertussis*. *Nigerian Veterinary Journal* 2015;135(Suppl 2):968-974.
3. Emikpe BO, et al. Experimental infection of Peste des petit ruminant Virus and *Mannheimia haemolytica* A2 in goats: immunolocalization of *Mannheimia haemolytica* antigens. *Veterinary Research Communications* 2010;34:569-578.
4. Gonçalves R, et al. Atypical non-progressive pneumonia in goats. *The Veterinary Journal* 2010;183:219-221.
5. Markey B, et al. *Clinical Veterinary Microbiology E-Book*. Elsevier Health Science 2013;2:1-902.
6. Minka NS, et al. Physiological responses of food animals to road transportation stress. *African Journal of Biotechnology* 2009;8(Suppl 25):7415-7427.
7. Momin MA, et al. The epidemiology of bacterial pneumonia in Black Bengal. *The Bangladesh Veterinarian* 2014;31(Suppl 2):70-73.
8. Mahu M, et al. Non-haemolytic *Mannheimia haemolytica* as a cause of pleuropneumonia and septicemia in a calf. *Veterinary Microbiology* 2015;180:157-160.
9. Ponnusamy P, et al. Isolation, identification and antibiogram of *Mannheimia haemolytica* associated with caprine pneumonia in the Cauvery Delta Region of Tamil Nadu, India *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2017;6(Suppl 9):3118-3122.

10. Rahal A, et al. Environmental attributes to respiratory diseases of small ruminants. *Veterinary Medicine International* 2014;ID 853627: 1-10.
11. Silva FLR, et al. Desempenho produtivo em caprinos mestiços no Semiárido do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2000;29(Suppl 4):1028-1035.
12. Silva HW, et al. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável* 2012;2(Suppl 2):121-125.
13. Singh K, et al. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial–host interactions in bovine pneumonia. *Veterinary Pathology* 48(2) 338-348. *The American College of Veterinary Pathologists* 2011;48(Suppl 2):338-348.
14. Wild MA, et al. Detecting nonhemolytic *Pasteurella haemolytica* infections in healthy rocky mountain Bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): influences of sample site and handling. *Journal of Wildlife Diseases* 1991;27(Suppl 1):53-60.



Legenda das figuras

Figura 1: Pleuropneumonia por *M. haemolytica* em caprinos no Brasil. **A. Caprino.** Secreção nasal mucopurulenta. **B. Pulmão.** Área focalmente extensa de consolidação pulmonar dos lobos cranioventrais recoberta de fibrina. **C. Pulmão.** Consolidação bilateral dos lobos cranioventrais bilateral com deposição de fibrina. O pulmão está aumentado de volume e brilhante. **D. Pulmão.** Presença de acentuado infiltrado inflamatório neutrofílico em bronquíolo e em espaços alveolares, associado à necrose do epitélio bronquiolar e deposição de fibrina. HE, obj. 20x. **E. Pulmão.** Acentuado espessamento da pleura e de septos interlobulares, associado a infiltrado neutrofílico, fibrina, hemorragia e edema alveolar. HE, obj. 20x. **F. Placa Ágar sangue.** Colônias de *M. haemolytica* hemolíticas (à esquerda) e não hemolíticas (à direita).

3 CONCLUSÃO

Mannheimia haemolytica é o principal agente oportunista causador da pleuropneumonia em caprinos, contudo colônias não hemolíticas podem gerar a doença em animais acentuadamente imunodeprimidos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, J. F. F. Pneumonic pasteurellosis in a goat. **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, Tehran, v. 8, n. 4, p. 293-299, Sept. 2014.
- ACKERMANN, M. R.; BROGDEN, K. A. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 9, p. 1079–1088, July. 2000.
- AHMED, W. A.; MOHAMMED, R. J.; KHALAF, I. A. Molecular and phenotypical characterization of *Mannheimia haemolytica*. Isolated from goats in Baghdad Province. **Advances in Microbiology**, Wuhan, v. 7, n. 4, p. 304-314, Jan. 2017.
- ALEXANDER, T. W. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 1/2, p. 165-175. July. 2008.
- COSTA, R. G. *et al.* Caracterização do sistema de produção caprino e ovino na região semi-árida do Estado da Paraíba, Brasil. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 57, n. 218, p. 195-205, Jun. 2008.
- EKONG, P. S.; AKANBI, B. D.; ODUGBO, M. O. A case report of respiratory manheimiosis in sheep and goat complicated by *Bordetella parapertussis*. **Nigerian Veterinary Journal**, Abuja, v. 35, n. 2, p. 968-974, 2014.
- EMIKPE, B. O. *et al.* Experimental infection of Peste des Petit Ruminant virus and *Mannheimia haemolytica* A2 in goats: immunolocalisation of *Mannheimia haemolytica* antigens. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, n. v. 34, n. 7, p. 569–578, Oct. 2010.
- FETT, T. *et al.* *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced cytolysis of caprine (*Capra hircus*) leukocytes is mediated by the CD18 subunit of β_2 -integrins. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 45, n. 6/6, p. 337–342, Nov/Dec. 2008.
- IBGE. **Produção da pecuária municipal**. 2013. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf. Acesso em: 08 de abr. 2017.
- IBGE. **Produção da pecuária municipal**. 2015. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf. Acesso em: 8 Abr. 2017.
- KAOUD, H. A. *et al.* Eco-epidemiologic aspects of *Mannheimia Haemolytica* in Egypt. **Researcher**, Lansing, v. 3, n. 2, p. 43-50, Jan. 2011. DOI: 10.7537/marsrsj030211.06.

- MAHU, M. *et al.* Non-haemolytic *Mannheimia haemolytica* as a cause of pleuropneumonia and septicemia in a calf. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 180, p. 157-160, Oct. 2015.
- MARKEY, B., *et al.* **Clinical veterinary microbiology**. 2. ed. London: Elsevier Health Science, 2013.
- MINKA, N. S.; AYO, J. O. Physiological responses of food animals to road transportation stress. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8 n. 25, p. 7415-7427, Dec. 2009.
- MOMIN, M. A. *et al.* The epidemiology of bacterial pneumonia in Black Bengal goats in Bangladesh. **The Bangladesh Veterinarian**, Mymensingh, v. 31, n. 2, p. 70-73, Apr. 2014.
- PONNUSAMY, P., *et al.* Isolation, identification and antibiogram of *Mannheimia hemolytica* associated with caprine pneumonia in the Cauvery Delta Region of Tamil Nadu, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 6, n. 9, p. 3118-3122, Sept. 2017.
- POULSEN, T. M. R. *et al.* Occurrence of haemolytic *Mannheimia* spp. in apparently healthy sheep in Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 48, n.19, p. 1-7, Oct. 2006.
- RAHAL, A. *et al.* Environmental attributes to respiratory diseases of small ruminants. **Veterinary Medicine International**, Cairo, 2014, ID 853627, p. 1-10, Mar.
- RICE, J. A. *et al.* *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 117-128, Dec. 2008.
- RICHARDSON, C. **Lowering stress in transported goats. Ontario Ministry of Agriculture and Food**, Sept. 2002. 4 p. (Livestock Technology Branch). Disponível em em <http://www.ansc.purdue.edu/sh/resources/LoweringtheStressofTransportedGoatsOFS02.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- ROSA, F. B. *et al.* Doenças de caprinos diagnosticadas na região Central no Rio Grande do Sul: 114 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n.2, p. 199-204, fev. 2013.
- SANTOS, L. L. *et al.* Estudo da infestação de ovinos mestiços por *Eimeria* e *Strongyloides* na região da zona da mata do estado de Alagoas. In: ZOOTECA - a zootecnia e o agronegócio, 2004, Brasília, DF. **Anais**. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

- SABRI, M. Y.; SHAHROM-SALISI, M.; EMIKPE, B. O. Comparison prior and post vaccination of inactivated recombinant vaccine against mannheimiosis in boer goats farm in Sabah. **Journal of Vaccines and Vaccination**, Rockville, v. 4, n. 1, p. 1-4, Jan. 2013.
- SINGH, K.; RITCHEY, W.; CONFER, A. W. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial–host interactions in bovine pneumonia. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n. 2, p. 338-348, Jan. 2011.
- TAHAMTAN, Y.; MIRGHAFAR, H. Classification, capsular PCR typing and genetic diversity of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and goats in Iran using Bam HI, Hind III restriction endonuclease enzymes by PCR-RFLP. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v. 33, n. 3, p. 535–542, Apr. 2016.
- TAJIK, J.; NAZIFI, S.; ESHTRAKI, R. The influence of transportation stress on serum cortisol, thyroid hormones, and some serum biochemical parameters in iranian cashmere (Raini) goat. **Journal Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v. 86, n. 6, p. 795-804, Mar./Apr. 2016.
- VIANA, L. *et al.* Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em ovinos sadios e com enfermidade respiratória. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1579-1582, Nov. 2007.
- YENER, Z. *et al.* Immunohistochemical detection of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* antigens in goats with natural pneumonia. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 305–313, Oct. 2009
- ZECCHINON, L.; FETT, T.; DESMECHT, D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. **Veterinary Research**, Paris, v. 36, n. 2, p. 133-156, Mar. 2005.