

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária



AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA NA PREVENÇÃO DA RINITE ATRÓFICA

José Lúcio dos Santos

Belo Horizonte
Minas Gerais
1981

José Lúcio dos Santos

76330000
Cópia
1981

AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA NA PREVENÇÃO DA RINITE ATRÓFICA

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



968582110000

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

05/02/2004

Belo Horizonte
Minas Gerais
1981

Santos, José Lúcio dos, 1952

S237a

Avaliação de uma bacterina na prevenção da rinite atrófica. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1981.

67p. ilustr.

Bibliografia

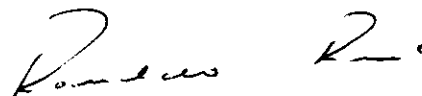
Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Rinite atrófica - Suíno. 2. Vacina inativada.

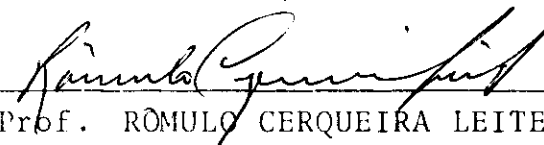
I. Título

CDD - 636 408 962 05

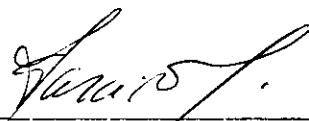
Tese aprovada em 10/07/1981



Prof. RONALDO REIS
- Orientador -



Prof. ROMULO CERQUEIRA LEITE



Prof. ERNANE LAGUNDES DO NASCIMENTO

Aos meus pais,
pelo exemplo;
à minha esposa Maria,
pelo estímulo e compreensão;
ao meu filho Daniel,
pela compreensão.

O presente trabalho contou com o apoio financeiro da FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA (FEP-MVP) e do PROGRAMA DE SAÚDE ANIMAL DO CONSELHO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Prof. LUIZ HEMETÉRIO DUTRA MARTINS CARNEIRO, pela oportunidade concedida.

Ao Prof. RONALDO REIS, pela valiosa orientação e apoio na realização deste trabalho.

À Associação Mineira dos Criadores de Suínos, na pessoa do Presidente, Dr. ARY GUIMARÃES.

Ao Prof. RÔMULO CERQUEIRA LEITE, pelo estímulo e ajuda.

Ao Zootecnista VANDO PEREIRA NUNES, pela colaboração na montagem e acompanhamento do experimento.

Ao Prof. IVAN BARBOSA MACHADO SAMPAIO, pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. JOSÉ AILTON DA SILVA, pela colaboração na montagem das tabelas.

Ao Sr. GUIDO A. DE CAUX, pela revisão lingüística.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, pela prestimosa colaboração.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo incentivo e convívio agradável.

À Bibliotecária STELLA MARIS BORGES, pela revisão bibliográfica.



RESUMO

Quatro amostras de *B. bronchiseptica*, em fase I, isoladas de caso clínico, foram utilizadas na preparação de uma bacterina, com título de 1×10^{10} bactérias/ml, inativadas pelo formol e adsorvidas em gel de hidróxido de alumínio.

Ao teste de potência em camundongos, a bacterina diluída a 10^{-1} protegeu 90% dos animais desafiados com 100 DL₅₀/0,2 ml de *B. bronchiseptica*.

Em suínos, a nível de campo, a vacina foi testada da seguinte forma: formaram-se três grupos - A, B e C, com oito porcas gestantes em cada. No grupo A, as porcas foram vacinadas aos 60-70 e 100 dias de gestação e suas leitegadas, aos sete e 28 dias. No grupo B, as porcas não foram vacinadas, mas apenas suas leitegadas, aos sete e 28 dias e o grupo C foi o controle, com porcas e leitegadas não vacinadas. Aos quatro, cinco e 10 dias, respectivamente, seis leitegadas de cada um dos grupos A, B e C foram desafiados com 0,5 ml de uma cultura com 1×10^{10} /ml de *B. bronchiseptica*. Todas as leitegadas aos 28, 56, 90, 120, 150 e 180 dias foram examinadas para os seguintes aspectos: secreções mucosas e purulentas, espirros, hemorragia nasal, dificuldade respiratória, bacteriologia nasal e sorologia

para *B. bronchiseptica* e peso médio.

Observou-se uma redução dos sinais clínicos e mais rápida e acentuada descontaminação nasal para *B. bronchiseptica* nos sub-grupos A_1 e A_2 vacinados, em relação aos controles não vacinados. O título médio de anticorpos séricos aglutinantes nas porcas do grupo A, antes da primovacinação era de 1:17,50. Após a segunda vacinação, o título elevou-se para 1:960,00. A transferência de anticorpos passivos da porca aos leitões, verificados aos sete dias pós-parto, apresentou títulos médios de 1:354,66. Aos 180 dias o grupo vacinado era 15% (14 kg) mais pesado do que os grupos não vacinados. A média de peso dos sub-grupos vacinados, a partir dos 56 dias, foi estatisticamente significativa em relação aos controles não vacinados.

Não foram observadas reações adversas gerais ou locais, após a inoculação da vacina em camundongos, porcas e leitões.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

A Rinite Atrófica Infecciosa (RAI) é uma doença transmissível, caracterizada por atrofia dos cornetos nasais, desvio de septo nasal e em casos severos, rarefação dos ossos nasais, pré-maxilar ou maxilar. A espiral inferior do corneto ventral é a região mais comumente afetada, embora qualquer porção dos cornetos dorsais, ventrais e etmóide possam ser envolvidos. As lesões aparecem comumente em suínos entre dois e cinco meses de idade. A *Bordetella bronchiseptica* coloniza a cavidade nasal e é considerada como o agente primário da RAI nos suínos. Outros agentes bacterianos, vírus e micoplasmas podem aumentar o rol dos agentes secundários que participam da etiologia da doença (CROSS & CLAFLIN, 1962; SWITZER & FARRINGTON, 1975).

A RAI foi descrita pela primeira vez por FRANQUE, na Alemanha, em 1850; a partir daí, ela foi diagnosticada em todos os países do mundo onde se criam suínos. Entre nós, o primeiro relato remonta a 1962, no Rio Grande do Sul e recentemente, em 1978, em Santa Catarina, onde se constatou uma frequência de 32,78% e em 53 (61,62%) de 86 suínos, foi isolado *B. bronchiseptica*. GOODNOW (1977) estima que a doença tenha uma frequência mundial de 45% nos rebanhos suínos.

As perdas provocadas pela RAI têm sido relatadas sob diversos aspectos, mas sabe-se que a principal está no ganho de peso deficiente, quando comparado com animais sadios. A variação do ganho de peso é de 5,2 a 10% quando os animais estão afetados medianamente, podendo chegar a 20% ou mais, quando estão gravemente afetados. Além disso, animais infectados com *B. bronchiseptica* são mais propícios a contrair pneumonia.

As medidas de controle da RAI, empregados em diversos países, são: a) uso de sulfas e antibióticos (clo-ranfenicol e tetraciclinas) que descontaminam a cavidade nasal dos suínos afetados pela *B. bronchiseptica*; b) vacinação com bacterinas produzidas com *B. bronchiseptica*, que protegem os leitões contra a forma clínica; c) eliminação dos animais positivos à bacteriologia nasal para *B. bronchiseptica*.

O uso de antibióticos resulta no aparecimento de amostras resistentes a *B. bronchiseptica*, além dos custos elevados, o que tem motivado os pesquisadores de países mais desenvolvidos e de suinocultura mais intensiva ao desenvolvimento de bacterinas contra a RAI.

Apesar da doença ser frequentemente diagnosticada em criações de suínos do Brasil, a determinação da prevalência por região ou Estado não foi realizada até o presente. Os trabalhos de pesquisa sobre a doença entre nós são escassos. Com base em observações clínicas, a RAI é uma enfermidade altamente disseminada no nosso meio e seria altamente desejável o desenvolvimento de um método de controle e/ou prevenção, que satisfizesse os requisitos de eficiência, economia e de aplicação prática nas condições brasileiras.

Assim, os objetivos do presente trabalho são:

- produzir uma bacterina de *B. bronchiseptica*, a partir de amostras isoladas de casos de campo;
- avaliar a eficiência da bacterina em camundongos;

- avaliar a eficiência da bacterina em um rebanho afetado por rinite atrófica clínica, quanto a:

a) descontaminação da cavidade nasal de suínos portadores de *B. bronchiseptica*;

b) redução da rinite atrófica clínica;

c) ganho de peso, do nascimento à desmama;

d) ganho de peso à idade de abate (6 meses);

e) indução da produção de anticorpos aglutinantes séricos contra *B. bronchiseptica* nas porcas e nos leitões;

f) esquema mais efetivo de vacinação no controle da RAI.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As propriedades da fração antigênica de *B. bronchiseptica* foram estudadas por ELDERING (1941). A fração solúvel protegeu camundongos contra a infecção homóloga e diminuiu o grau da infecção por *B. para-pertussis* e *H. pertussis*.

O ganho de peso deficiente da RAI foi estudado por SHUMAN & EARL (1956), em um rebanho de suínos submetidos a teste de performance. O diagnóstico da RAI foi realizado com a ajuda de um rinoscópio. A incidência da doença no rebanho foi de 45,9%, entre 1952 e 1953. A RAI não pode ser a causa responsável pelos suínos que não completaram o teste de performance, embora a incidência da doença fosse maior nos suínos que não completaram o teste.

CROSS & CLAFLIN (1962) isolaram *B. bronchiseptica* em nove de 10 suínos amostrados, que representavam surtos epizoóticos separados. Oito, de nove animais inoculados com material dos cornetos de suínos com rinite atrófica natural, desenvolveram lesões macroscópicas da doença, dos quais se isolou o agente. *B. bronchiseptica* isolada de cornetos e cultivada em meios artificiais, quando inoculada em seis suínos, reproduziu o quadro de Rinite Atrófica em quatro deles.

EARL et alii (1962) examinaram 1099 animais submetidos a teste de performance no Centro de Pesquisa em Agricultura de Beltsville, Maryland, EUA, e dentre eles, 436 (39,7%) apresentaram Rinite Atrófica. Os animais foram divididos em quatro grupos. Observaram ainda que o número de suínos com desvio de nariz foi pequeno e que a Rinite Atrófica interfere adversamente na taxa de ganho de peso dos animais.

GUERREIRO et alii (1962) diagnosticaram Rinite Atrófica em uma granja no Rio Grande do Sul e isolaram em um dos 25 animais doentes *P. multocida*, "o agente" da doença. Em um levantamento posterior em 1000 estabelecimentos de criadores de suínos, a doença não foi constatada. Alertaram para importância que esta doença pode representar para a suinocultura estadual, especialmente em face aos danos que causaria.

ROSS et alii (1963b) determinaram a incidência de certos microorganismos em suínos, em Iowa e verificaram que 54% dos rebanhos estavam afetados por *B. bronchiseptica*, e 5% por *Pasteurella multocida*, sem correlacionar, no entanto, com a frequência de Rinite Atrófica.

ROSS et alii (1963a) observaram que 66% de 15 suínos livres de doenças respiratórias, infectados na 4a. semana de idade, com culturas puras de *B. bronchiseptica*, desenvolveram de leve a moderada atrofia dos cornetos. Noventa e quatro por cento de 16 suínos infectados aos três dias de idade desenvolveram de leve a grave atrofia dos cornetos. O agente foi re-isolado em grande escala nos animais infectados. Tentativa de estabelecer infecção em porcas de dois anos foi negativa.

DUNCAN et alii (1966) produziram rapidamente lesões de Rinite Atrófica pela inoculação intranasal de *B. bronchiseptica* em leitões de três dias de idade. As lesões foram mais proeminentes e a recuperação mais tardia (5 meses), em comparação com suínos inoculados na 4a. semana de

idade. Estes provavelmente apresentaram recuperação a partir da 6a. à 8a. semana pós-inoculação. A *B. bronchiseptica* foi encontrada entre os cílios, não invadindo a camada sub-epitelial. O rápido crescimento de suínos jovens seguido por aumento do tamanho da cavidade nasal, quando acompanhado por uma supressão do crescimento normal dos cornetos pela rinite bacteriana, resulta na aparência macroscópica de atrofia. A aparência de atrofia seria uma resposta hipoplásica do corneto, a uma irritação específica e é acentuada pelo crescimento normal da cavidade nasal. A habilidade de regeneração dos cornetos atrofiados foi claramente demonstrada neste estudo.

HARRIS & SWITZER (1968) verificaram que *P. multocida* tipo D pode estabelecer e persistir na cavidade nasal de suínos, quando um condicionamento do epitélio nasal tenha sido induzido pela *B. bronchiseptica*. Inóculo de *P. multocida* preparado através de várias passagens em ovos embrionados de galinha, para obter o máximo de virulência, não foi capaz de permanecer na cavidade nasal de suínos. A infecção concurrente com *P. multocida* e *B. bronchiseptica* aumenta a intensidade das mudanças microscópicas, sendo associada com o aumento da reabsorção óssea.

HARRIS & SWITZER (1969) trataram suínos com sulfonamidas, livrando suas cavidades nasais da amostra virulenta de *B. bronchiseptica*. Estes suínos manifestaram resistência à reinfecção, a qual também apareceu em suínos após a infecção causada por uma amostra de baixa virulência de *B. bronchiseptica*, que foi eliminada naturalmente de 3 a 5 semanas. A resistência nasal permaneceu por 125 dias, após a exposição inicial à amostra de baixa virulência.

HARRIS et alii (1969) observaram um decréscimo de 29% no número de rebanhos infectados com *B. bronchiseptica* desde 1962, motivado pelo uso de sulfonamidas, como aditivo, na ração. A prevalência poderia ser menor, caso não

surgissem amostras de *B. bronchiseptica* resistentes às sulfonamidas. Vinte por cento dos rebanhos de Iowa estavam infectados com *B. bronchiseptica* resistentes à sulfonamidas.

HAMORI (1970) afirma que a doença não é hereditária por si só, mas por uma pré-disposição, que, ao desenvolver, os animais perdem a resistência natural ou a habilidade para adaptação e aclimatação. Estas são as razões pelas quais ocorre, em forma de surtos, a rinite atrófica nos rebanhos.

KANG et alii (1970) encontraram anticorpos aglutinantes em suínos naturalmente infectados somente a partir da 20a. semana de vida. Executaram testes de patogenicidade das amostras de *B. bronchiseptica*, produziram antígeno e realizaram várias análises para obter um padrão de sensibilidade e especificidade.

KANG et alii (1971) observaram que a infecção por *Bordetella* ocorre na creche ou em unidades da fazenda, da porca para os recém-nascidos ou de um suíno para outro. Nos casos de infecção natural, a nível de campo, observaram uma tendência na curva de isolamento de *B. bronchiseptica* e a demonstração de anticorpos aglutinantes que cruzam com o avanço da idade; enquanto a taxa de isolamento diminui a de anticorpos aglutinantes aumenta. As lesões foram encontradas em 85 suínos (91,4%), de 93 sorologicamente positivos. De 110 com lesões de Rinite Atrófica, 85 (77,3%) deram resultados positivos no teste de aglutinação. Nenhuma relação foi encontrada entre a severidade das lesões e o grau de resposta imunitária (anticorpos), mas em 85 casos (91,4%) de 93 sorologicamente positivos, as lesões e a resposta imunitária foram observadas simultaneamente. Geralmente, anticorpos aglutinantes tornam-se detectáveis entre o 3º e 4º mês, enquanto o isolamento do organismo torna-se difícil após esta idade.

SHIMIZU et alii (1971) inocularam *B. bronchiseptica* em seis suínos nascidos por histerectomia e privados de colostro. Os animais revelaram típica atrofia dos cornetos,

tanto macroscópica como microscópica. Este fato, segundo os autores, indica que a *B. bronchiseptica* é um dos agentes etiológicos da Rinite Atrófica nos suínos. Ao mesmo tempo, foram colhidas novas informações sobre o desenvolvimento da bactéria após a infecção nos suínos, a tendência ao desaparecimento dos órgãos respiratórios e a produção de anticorpos aglutinantes.

HARRIS & SWITZER (1972) após vacinarem suínos e os desafiarem, concluíram que aparentemente a vacina não previne a infecção, mas propiciou eliminação do agente mais rápido do que nos controles não vacinados. A tentativa de diminuir infecção em suínos infectados com amostra virulenta de *B. bronchiseptica*, através da inoculação de vacina com *B. pertussis*, sete dias após infecção intranasal, não obteve sucesso. Altos títulos de anticorpos existiam no soro de suínos vacinados com *B. bronchiseptica*, inativada pelo ultra-som; nos suínos inoculados com vacina de *B. pertussis*, os títulos de anticorpos no soro permaneceram constantes durante a infecção com amostra virulenta. À época da descontaminação nasal os títulos diminuíram.

SWITZER & FARRINGTON (1972) ponderam que o estudo de culturas recuperadas de suínos infectados não permite avaliação da virulência do organismo. Não há, atualmente, qualquer método prático para avaliar a virulência, exceto a via de inoculação em suínos jovens susceptíveis. Através de levantamento com método de "swabb" nasal, em 25 rebanhos, no Estado de Iowa, Estados Unidos, encontraram 24 positivos para *B. bronchiseptica*, dos quais 19 apresentavam sintomas clínicos de Rinite Atrófica. Através de um sistema de depopulação dos rebanhos, ou dos animais afetados e repopulação com animais livres de *B. bronchiseptica*, os autores conseguiram que 16 rebanhos dos 19 clinicamente afetados, produzissem suínos que não tinham evidência clínica da doença na idade do desmame. Dos 16 rebanhos, em 14 foram realizados "swabs" nasais e encontraram 10 livres de *B.*

bronchiseptica.

KEMENY & AMTOWER (1973) utilizaram um teste de aglutinação para detectar anticorpos naturais contra *B. bronchiseptica* do soro de 451 porcas com idade entre 1 e 36 meses. O antígeno consistiu de uma suspensão em salina a 0,85%, de *B. bronchiseptica* inativada por formol e estandarizada fotometricamente para conter 2×10^{10} organismos/ml. Sugerem a utilização da detecção de anticorpos aglutinantes contra *B. bronchiseptica*, como um método de diagnóstico da infecção em rebanhos suínos.

KOSHIMIZU et alii (1973a) reproduziram a Rinite Atrófica em 29 leitões L.W. x L. e acreditam que nas infecções naturais o anticorpo materno pode influir na atrofia dos cornetos em leitões. O título dos anticorpos era de 1:320 aos cinco dias de idade e declinou gradualmente até 1:10 ou menos na 8a. semana de idade, quando iniciou a resposta de anticorpos específicos contra a infecção com *B. bronchiseptica*. Entretanto, consideram que muitos suínos jovens podem não reagir suficientemente contra os organismos estabelecidos na superfície do epitélio nasal. Os resultados sugerem que a infecção horizontal de *B. bronchiseptica* pode ocorrer naturalmente entre leitões.

KOSHIMIZU et alii (1973b) demonstram que o número de organismos (*B. bronchiseptica*) na cavidade nasal não declinava significativamente, apesar da presença de altos níveis de anticorpos após a injeção de bacterina de *B. bronchiseptica* em animais previamente infectados.

OGATA et alii (1973) compararam a aglutinação produzida entre organismos vivos ou formolizados e soro de suínos natural ou artificialmente infectados. Verificaram que culturas inativadas pelo formol e em fase I, cultivados em "agar charcoal" ou ágar sangue, mostraram satisfatórias no diagnóstico de infecção em suínos por *B. bronchiseptica*.

NAKAGAWA et alii (1974) infectaram seis leitões

nascidos de histerectomia, e que não receberam colostro, com *B. bronchiseptica* aos 2, 8, 11 e 15 dias de idade. Os animais desenvolveram rinite catarral com atrofia dos cornetos.

FETTER et alii (1975) encontraram mudanças degenerativas progressivas em osteócitos e osteoblastos em suínos afetados. Estas mudanças incluíam aumento das mitocôndrias, distensão da cisterna do retículo endoplasmático e lise de algumas células. Organismos bacterianos, que os autores acreditaram ser *B. bronchiseptica*, foram observados no citoplasma e muito próximos da superfície óssea dos suínos afetados.

SWITZER & FARRINGTON (1975) afirmam que a etiologia da RAI esteve em discussão por mais de um século; entretanto, hoje sabe-se que a *B. bronchiseptica* é o agente etiológico primário da doença. Discutem as várias teorias da etiologia e apresentam a distribuição nos rebanhos suínos em vários países. Mencionam os sinais clínicos e a metodologia para diagnóstico e tratamento.

NAKASE et alii (1976) observaram que a vacina inativada por Thimerosal e gel de hidróxido alumínio como adjuvante efetivamente reduz a incidência de lesões severas na atrofia dos cornetos causada pela *B. bronchiseptica*. Observaram ainda que anticorpos inibiram o crescimento de *B. bronchiseptica* na cavidade nasal e possivelmente atenuaram sua virulência.

FARRINGTON & SWITZER (1976) estimam que 50% de todos os suínos com peso de mercado nos Estados Unidos possuem algum grau de atrofia dos cornetos. Afirmam ainda que a *B. bronchiseptica* pode também causar pneumonia primária em suínos susceptíveis. Fatores de manejo, substâncias irritantes não infecciosas e bactérias, tais como *P. multocida*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium necrophorus* e *Haemophilus* sp podem participar da patologia intensificando a doença. Devido ao fato das sulfas te-

rem sido incluídas na ração como estimulante do crescimento, tem sido encontrado recentemente, que 70 a 80% das *B. bronchiseptica* isoladas de suínos, são resistentes às sulfas. Os autores ainda afirmam que há um padrão natural de descontaminação da infecção e está associado à idade. Assim, 90% dos suínos entre 4 a 10 semanas têm a cavidade nasal infectada. Esta infecção declina gradualmente até aproximadamente 10-12 meses de idade. Somente 10 a 15% dos animais da criação podem permanecer como portadores infectados e podem servir como reservatórios da infecção.

NIELSEN et alii (1976) transferiram suínos "gnotobióticos" de 3 meses de idade para unidade de criação convencional, onde ocorria Rinite Atrófica. Estes animais desenvolveram atrofia dos cornetos, poucas semanas após.

POWELL (1976) baseou-se em estudos epidemiológicos e patológicos para indicar a porca como fonte primária da infecção para leitões. Um rebanho tipicamente infectado pode revelar culturas positivas em suínos jovens, variando entre 40 e 50%, enquanto as porcas do rebanho podem somente revelar 10% de culturas positivas. A detecção e eliminação de porcas positivas do rebanho é vital para o controle da transmissão de *B. bronchiseptica*.

JONG et alii (1976) afirmam que a participação de vírus no desenvolvimento de Rinite Atrófica não está clara. Sugerem o uso de vacinação das porcas com bacterinas de *B. bronchiseptica* e/ou *P. multocida*, como uma das medidas de controle da Rinite Atrófica.

GOODNOW (1977) afirma que a Rinite Atrófica ocorre com uma frequência de 45% ou mais nos suínos normais, de mercado, produzidos no meio-oeste dos Estados Unidos e no resto do mundo. O uso indiscriminado de sulfas tem resultado em muitas amostras de *B. bronchiseptica* resistentes a esta droga. Oitenta por cento das amostras isoladas em um levantamento foram resistentes às sulfonamidas.

BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977) afirmaram que vacinação é o melhor método de controle da infecção por *B. bronchiseptica*. A Rinite Atrófica pode aparecer antes da idade do desmame; assim, é imprescindível dar aos leitões a possibilidade de proteção após o nascimento. Sugerem, ainda, o seguinte esquema de vacinação:

- porcas : 60 e 100 dias de gestação, com 1 ml intramuscular
- leitões: 0,5 ml subcutâneo aos 7 dias de idade

Porcas com título sorológico negativo para *B. bronchiseptica* são também, usualmente negativas, quando a flora nasal é testada para cultivo do agente. Verificaram que leitões de porcas com alto título pós-parto mantiveram títulos altos até 7 semanas, apesar de receberem uma dose de vacina aos 7 dias de idade.

GOODNOW et alii (1977) avaliaram a potência de quatro bacterinas contra a Rinite Atrófica em camundongos e suínos. As vacinas seriam consideradas aprovadas, se $\geq 80\%$ dos camundongos sobrevivessem ao desafio intraperitoneal, 14 dias após a imunização pela mesma via, enquanto $\leq 20\%$ dos não vacinados poderiam sobreviver ao desafio. Afirmaram, ainda, que o teste de potência dá um resultado aceitável em 25 dias e provou ser estatisticamente satisfatório.

PEDERSEN & BARFOD (1977) estudaram a ocorrência de atrofia dos cornetos de suínos em relação à vacinação de porcas com bacterina de *B. bronchiseptica* durante a gestação. Uma menor frequência de atrofia dos cornetos foi encontrada entre suínos, filhos de porcas vacinadas, comparados com os de porcas não vacinadas.

BRANDENBURG (1978) pesquisou anticorpos nasais e séricos em dois grupos de suínos vacinados com bacterinas de *B. bronchiseptica*, inativadas por formol ou ultrassom e comparou os resultados com um grupo não vacinado. O teste de aglutinação em tubo foi usado para determinar os

títulos aglutinantes. Em seguida à vacinação, todos os suínos foram desafiados por via intranasal com a mesma amostra usada no preparo da bacterina de *B. bronchiseptica*. Os títulos de anticorpos séricos excederam e persistiram por maior tempo que os anticorpos nasais.

GOODNOW et alii (1978) observaram que uma reduzida taxa de ganho de peso, levando a um aumento do período de terminação, tem sido associada com a Rinite Atrófica endêmica e verificaram que a média de ganho de peso diário, do nascimento ao desmame, em suínos vacinados, era significativamente maior (15%), do que em suínos não vacinados.

JENKINS (1978) desenvolveu e usou para detectar anticorpos em suínos naturalmente infectados com a *B. bronchiseptica*, um teste de aglutinação que utilizou antígeno inativado pelo formol e com células portadoras de cápsula. O teste identificou como positivos 210 ou 60% de 342 amostras de soro de 42 rebanhos convencionais de criação de suínos, enquanto a técnica do "swabb" somente detectou 34 ou 10% de positivos para *B. bronchiseptica*. O teste foi relativamente livre de reações cruzadas; entretanto, 2,7% do soro de suínos em crescimento e 13,7% de adultos ou caçaços, reagiram com antígeno de *P. multocida*. Somente reações de aglutinação iguais ou superiores a 1:20 para *B. bronchiseptica* são consideradas positivas.

GOODNOW et alii (1979) observaram uma redução significativa em dias do nascimento até atingir 100 kg de peso nos grupos vacinados e controle, que atingiram, respectivamente, esta marca em 171 e 178 dias, num rebanho levemente afetado por Rinite Atrófica. A doença clínica ocorreu em 1 de 28 (3%) dos suínos vacinados e em 12 de 22 (54%) dos controles. Em outro rebanho, onde era extremamente severa a Rinite Atrófica, a média de ganho diário para suínos vacinados foi de 99,88 g por dia a mais do que os suínos controles, atingindo aqueles suínos de 100 kg de peso

46 dias antes dos animais controles.

LONCAREVIC et alii (1979) vacinaram leitões de 25 dias de 14 leitegadas, com duas doses de vacina inativada, preparada de amostra de *B. bronchiseptica* patogênica. Reações gerais foram observadas em 14% dos leitões.

YOKOMIZO & SHIMIZU (1979) verificaram que as mudanças morfológicas no epitélio nasal foram claramente demonstradas em leitões inoculados com organismos, em fase I. Pronunciada perda de cílios e aderência de numerosas bactérias aos reduzidos cílios foi o quadro predominante. Em contraste, nenhuma destas mudanças foram observadas na mucosa nasal de suínos inoculados com bactérias em fase III. Exame ao microscópio eletrônico de varredura da mucosa nasal infectada com *B. bronchiseptica*, revelou que os organismos aderiram preferencialmente as células epiteliais ciliadas. Nenhuma aderência foi vista em população de células não ciliadas. Observaram, ainda, que anticorpos contra o antígeno de superfície termo-lábil, de organismos em fase I, efetivamente inibiram "in vitro" a aderência de de bactérias nas células nasais.

SMITH & BASKERVILLE (1979) utilizaram meio seletivo para isolamento de *B. bronchiseptica* em "swabbs" diretos da cavidade nasal de suínos. O meio G20G foi o que mais efetivamente inibiu o crescimento de outras bactérias da flora nasal de suínos e o mais satisfatório para isolamento de *B. bronchiseptica* de cães e cavalos.

MUIRHEAD (1980) seguiu durante um ano, 100 porcas infectadas por *B. bronchiseptica* e avaliou as perdas provocadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento e seleção das amostras

Quatro amostras de *B. bronchiseptica*, em fase I, isoladas de caso clínico a nível de campo, foram selecionadas para a produção da vacina.

O isolamento foi feito em ágar Mac Conkey*, contendo 1% de glicose. A caracterização bioquímica se fez através das provas de citrato de Simmons, caldo uréia, leitornassolado e ágar nitrato, motilidade entre lâmina e lâminula pelo microscópio de contraste de fase.

As fases I e III foram reconhecidas pela presença ou ausência de cápsula, observada na coloração específica e nas características das colônias.

3.2. Produção de vacina

A vacina foi produzida pelo crescimento isolado de cada uma das amostras de *B. bronchiseptica*, em infusão de cérebro e coração**, com 2% de soro de bezerro, durante 24 horas, a 37°C, sob agitação constante, em estufa de am-

* Difco Laboratories - Detroit

** Difco Laboratories - Detroit

biente controlado. Após incubação, coloração pelo Gram e coloração da cápsula, foram realizados testes em cada amostra, para verificar pureza da vacina e presença da cápsula.

Ao final, todas as quatro amostras foram reunidas em volumes iguais, inativadas com formolaldeído a 37%, na concentração de 0,2%, por 12 horas, a 37°C e adsorvidas em gel de hidróxido de alumínio, a 30%. O título da vacina foi determinado antes da inativação, por diluições sucessivas em caldo simples e contagem de colônias em placas de ágar simples.

Realizaram-se provas de esterilidade em placas de ágar sangue, tioglicolato e tarozzi e inocuidade, através da inoculação intra-peritoneal de 0,2 ml em 10 camundongos seguida de observação por 10 dias.

3.3. Teste de potência da vacina

Formaram-se cinco grupos de 10 camundongos, sendo todos machos com peso de 18 a 22 g cada. Em cada animal aplicou-se 0,2 ml por via intraperitoneal (IP) da vacina, nas seguintes diluições: 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} e não diluída. A diluição da vacina foi feita em salina fisiológica, pH 7,2, o grupo testemunha foi inoculado apenas com salina. Quinze dias após, todos os camundongos foram desafiados com 100 DL₅₀/0,2 ml de *B. bronchiseptica*, em fase I, por via intraperitoneal e foram observados durante 10 dias. A vacina seria considerada satisfatória se 80% ou mais dos camundongos vacinados com a vacina não diluída e 20% ou menos dos testemunhas sobrevivessem ao desafio (GOODNOW et alii, 1977).

3.4. Seleção da granja

A seleção da granja em que se desenvolveu o tra-

balho a nível de campo baseou-se na presença de RAI clínica e no isolamento de *B. bronchiseptica*, em 21 suínos, entre 60 e 150 dias. A granja realizava, normalmente, controle de peso individual ao nascimento, à desmama e ao abate, seleção e venda de animais registrados das raças Landrace e Large White, venda de animais comerciais para abate. O manejo sanitário, além de medidas gerais de limpeza e desinfecção, incluía vacinações regulares contra Peste Suína Clássica e Ruiva. Possuía 300 matrizes que eram mantidas em gaiolas individuais, durante parte da lactação, e depois transferidas para creches em lotes de seis porcas até a idade de desmama - 35 dias. Após a desmama, as porcas e leitões eram colocados em baias coletivas. As amostras de *B. bronchiseptica* isoladas da granja, foram submetidas ao antibiograma sob forma de "pool".

3.5. Vacinação dos suínos

Foram constituídos três grupos: A, B e C, com oito porcas cada. No grupo C, as porcas e suas leitegadas não foram vacinadas e serviram como controle. No grupo B, as porcas não foram vacinadas e os leitões vacinados aos sete e 28 dias, por via subcutânea, com uma dose de 2 ml. No grupo A, as porcas foram vacinadas aos 60-70 e 100 dias de gestação e os leitões aos sete e 28 dias, pela mesma via e dose de B.

3.6. Bacteriologia e sorologia das porcas

Aos 60-70 e 100 dias de gestação e aos sete dias pós-parto, foram colhidos, de todas as porcas, "swabb" nasal e sangue para isolamento e sorologia de *B. bronchiseptica*, respectivamente.

3.7. Desafio

Aos quatro, cinco e 10 dias de idade foram desafiados, respectivamente, seis leitegadas de cada um dos grupos A, B e C que passaram, então, a constituir os tratamentos ou sub-grupos A₁, B₁ e C₁. As leitegadas restantes de cada grupo formaram os tratamentos ou sub-grupos A₂, B₂ e C₂, conforme TAB. I. Através do uso de uma seringa de plástico de 1 ml, sem agulha, colocou-se, em cada narina dos leitões, 0,25 ml de um caldo de cultura de amostras de *B. bronchiseptica*, isoladas na própria granja. O título deste "pool" de seis amostras em fase I situava-se em 1×10^{10} bactérias/ml.

3.8. Observação dos animais

3.8.1. Sinais clínicos

Aos 28, 56, 90, 120, 150 e 180 dias, em todos os grupos, realizaram-se exames clínicos, sendo observada a presença de secreções mucosas e purulentas, espirros, hemorragia nasal e dificuldade respiratória.

3.8.2. Isolamento nasal de *B. bronchiseptica*

Aos sete, 28, 56, 90, 120, 150 e 180 dias foram feitos "swabbs" nasais em todos os leitões. A limpeza da parte externa das fossas nasais foi executada com algodão embebido em álcool comercial a 95%. Após a evaporação do álcool, o "swabb" era introduzido até a metade do comprimento da cavidade nasal, em ambas as narinas. Como o tempo decorrido entre a colheita e o processamento deste era superior a 20 horas, foi-lhe adicionado meio de transporte. O volume do meio de transporte, em cada tubo, foi fixado em 1,5 ml. O meio usado constituía-se de uma solução de Hanks, com 5% de soro de bezerro. Em seguida, o

TABELA I - Número de porcas e de leitões, desafiados e não desafiados, de acordo com os sub-grupos

Sub- grupos	Porcos		Leitões	
	Nº	Vacinados aos 60 e 100 dias de gestação	Vacinados aos 7 e 28 dias	Desafiados intranasal
C ₁	6	-	-	49
C ₂	2	-	-	-
B ₁	6	-	51	51
B ₂	2	-	18	-
A ₁	6	6	45	45
A ₂	2	2	14	-

"swabb" era acondicionado em caixa de isopor, refrigerado e transportado ao laboratório, onde era processado em placa de meio G20G. Após agitação do tubo contendo "swabb", este era retirado e em uma única posição espalhado sobre a placa, por esgotamento, como se fosse uma alça de platina. A contagem das colônias foi realizada após 48 horas de incubação, a 37°C.

3.8.3. Titulação de anticorpos

Colheu-se sangue para sorologia da fossa infra-orbital dos leitões, utilizando-se tubos de microhematócrito, de 75 x 1,5 mm, aos sete, 28, 56, 90, 120, 150 e 180 dias. O sangue, após coagulação em frasco individual, tipo penicilina, foi acondicionado em caixa de isopor, refrigerado e transportado ao laboratório, centrifugado e o soro estocado a -20°C, até o momento do uso.

O soro era depositado nos tubos de hemólise, nas quantidades de 0,08; 0,04; 0,02 e 0,01 ml, usando-se pipeta de Huddleson. 1,5 ml de antígeno* era adicionado a cada tubo, levados ao banho-Maria a 56°C, por 4 horas. Decorrido esse tempo, os tubos eram deixados em repouso na geladeira até o dia seguinte, quando, então, eram retirados e permaneciam em temperatura ambiente por uma hora. Seguia-se, então, a leitura, que consistia em classificar como positivos, aqueles que apresentavam um depósito de flóculos brancos no fundo do tubo, com a coluna limpa e transparente. Reação incompleta era para aqueles tubos que apresentavam depósitos menores no fundo e a coluna semi-transparente. Consideraram-se negativos aqueles que não apresentavam floclulações brancas que se levantavam do fundo, após a agitação e que conti-

* O antígeno produzido, segundo JENKINS (1978), foi gentilmente cedido pelo Dr. Massami Nkajima

nham uma coluna turva. Para todas as provas foram utilizados controles negativos e positivos, com título de até 1:160.

3.8.4. Pesagem dos animais

Ao nascimento, à desmama (35 dias), aos 56, 150 e 180 dias, todos os leitões foram pesados.

3.8.5. Análise estatística

O título médio de anticorpos e o peso médio dos sub-grupos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de "Student".

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e seleção das amostras

As colônias de *B. bronchiseptica* isoladas de caso clínico, em ágar Mac Conkey, com 1% de glicose, após 48 horas apresentaram-se marron-acinzentadas, com área central escura. Mostraram positividade em citrato de Simmons; urea se positiva; alcalinizaram o leite tornassolado em 48-72 horas; reduziram nitrato a nitrito e motilidade positiva. A coloração pelo Gram foi negativa, com formas de bastonetes e/ou cocóides.

As colônias na fase I apresentaram-se ovóides, mucóides, branco-acinzentadas, hemólise β em placas de ágar sangue, de cavalo ou carneiro.

A coloração negativa para cápsula de esfregaços das colônias, reconhecidas em fase I, exibiam amplo halo em volta das bactérias.

4.2. Produção da vacina

As quatro bacterinas produzidas mostraram-se puras, crescimentos em fase I, estéreis após a inativação. A contagem apresentou 1×10^{10} bactérias/ml.

4.3. Teste de potência da vacina

Nos 15 dias subsequentes à vacinação não foi detectada nenhuma anormalidade e todos os camundongos permaneceram vivos.

A TAB. II mostra o número de camundongos vacinados e que sobreviveram ao desafio com 100 DL₅₀/0,2 ml de *B. bronchiseptica*. Noventa por cento dos camundongos vacinados com a vacina diluída a 10⁻¹ e 100% dos camundongos vacinados com a vacina não diluída resistiram ao desafio. Todos os outros camundongos morreram entre 24 e 72 horas, com a grande mortalidade próxima às 48 horas, após o desafio.

Os camundongos que morreram apresentaram uma fase clínica caracterizada por pelos arrepiados e aglutinados em volta dos olhos, que se apresentaram sempre fechados. Diarréia com fezes aderidas ao reto e à cauda. A morte sempre ocorria no mesmo dia em que se manifestavam os sintomas.

A necrópsia dos camundongos revelou enterite hemorrágica generalizada e hemorragia nos pulmões. Todas as vísceras apresentavam-se vermelho-escuras. Isolou-se *B. bronchiseptica* em fase I, de sangue dos ventrículos de todos os camundongos mortos.

4.4. Seleção de granja

No levantamento inicial da granja, em 21 animais, amostrados entre 60 e 150 dias de idade, isolou-se *B. bronchiseptica* em 10 animais. Destes, três apresentavam-se com desvio e retração nasal acentuados. Nas baias de recria, a freqüência de espirros era alta, situando-se entre 60 a 70% dos animais. A presença de áreas escuras em torno dos olhos era um achado comum.

A freqüência de espirros diminuía acentuadamente nas baias de engorda e mais ainda nas de terminação. Nes-

TABELA II - Resultado do teste de potência da bacterina em camundongos

Dias após o desafio	Mortalidade por diluições da vacina				Grupo controle inoçulado com salina fisiologica pH 7,2
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
1	0/10 (1)	0/10	0/10	1/10	0/10
2	0/10	1/10	9/10	9/9	10/10
3	0/10	0/9	1/1	-	-
4	0/10	0/9	-	-	-
5	0/10	0/9	-	-	-
6	0/10	0/9	-	-	-
7	0/10	0/9	-	-	-
8	0/10	0/9	-	-	-
9	0/10	0/9	-	-	-
10	0/10	0/9	-	-	-
11	0/10	0/9	-	-	-

(1) Numerador - nº de camundongos mortos

Denominador - nº total de camundongos vivos

tas, era possível observar alguns animais com desvio e retração nasal.

4.5. Vacinação dos suínos

As porcas e leitões não manifestaram qualquer reação adversa à vacina, seja de natureza local ou geral.

4.6. Bacteriologia e sorologia das porcas

Aos 60-70 dias de gestação foi isolado *B. bronchiseptica* nas porcas de números 1253 e 1314 (25%) do grupo C, números 110 e 1545 (25%) do grupo B e na 1523 (12,5%) do grupo A. Aos 100 dias de gestação, somente na porca 1545 (12,5%) do grupo B, foi isolado o agente bacteriano. Aos 10 dias pós-parto, não se isolou *B. bronchiseptica* em nenhuma das porcas.

As TAB. III, IV e V apresentam os títulos sorológicos das porcas dos grupos C, B e A. No grupo B, aos 10 dias pós-parto, somente colheu-se material das porcas de números 113 e 1055, que não tiveram suas leitegadas desafiadas. O título máximo aos 60-70 dias de gestação nos três grupos foi de 1:80, e 9 (37,5%) das 24 porcas, sendo três em cada grupo, apresentaram títulos iguais a zero. O título médio foi de 1:15,00; 1:21,25 e 1:17,50, nos grupos C, B e A; aos 100 dias de gestação, foi de 1:5,00; 1:26,25 e 1:420,00 e finalmente aos 7 dias pós-parto, a média foi de 1:7,50; 1:25,00 e 1:960,00. A porca 417 do grupo A não respondeu à vacinação.

4.7. Observação dos animais

Em face das amostras de *B. bronchiseptica*, isoladas na granja e utilizadas no desafio dos leitões, apresentarem alta sensibilidade ao cloranfenicol e tetraciclina.

TABELA III - Título aglutinante para *B. bronchiseptica* em porcas do grupo C não vacinadas, no período de gestação e aos sete dias pós-parto

Nº das porcas	Dias de gestação		7 dias pós-parto
	60	100	
454	20	-	-
775	-	-	-
1253	20	-	-
1314	20	20	20
1345	-	-	20
1348	-	-	-
1349	20	-	-
1447	40	20	20
Total	120	40	60
\bar{X}	1:15,00	1:5,00	1:7,50
s	14,14	9,25	10,35

TABELA IV - Título aglutinante para *B. bronchiseptica* em porcas do grupo B não vacinadas, no período de gestação e aos sete dias pós-parto

Nº das porcas	Dias de gestação		7 dias pós-parto
	60	100	
110	20	20	*
113	20 I	-	20 I
216	-	-	*
717	-	-	*
839	-	-	*
1055	40	80	40
1360	80	80	*
1545	20	40	*
Total	170	210	50
\bar{x}	1:21,25	1:26,26	1:25,00
s	27,48	35,02	21,21

* Não foi colhido soro destas porcas
I = Incompleto

TABELA V - Título aglutinante para *B. bronchiseptica* em porcas dos grupos A vacinadas, no período de gestação e aos sete dias pós-parto

Nº das porcas	Dias de gestação		7 dias pós-parto
	60	100	
19	40 I	640	1280
73	20 I	320	320
142	80 I	640	1280
143	-	320	1280
169	40 I	640	640
417	-	-	-
678	20 I	160	1280 I
1523	-	640	2560 I
Total	140	3360	7680
\bar{x}	1:17,50	1:420,00	1:960,00
s	21,21	255,67	616,71

I = Incompleto



na, estas drogas foram suprimidas no tratamento de quaisquer outras entidades mórvidas que, por ventura, acometessem as porcas e os leitões.

Em todos os sub-grupos ocorreram diarréias, principalmente por *E. coli*, em virtude da supressão de cloranfenicol empregado no tratamento. O tratamento indicado com nitrofuranos, a partir de antibiograma, não funcionou "in vivo". As diarréias e pneumonia, após a desmama, levaram à morte vários animais. Os sub-grupos A_1 e A_2 foram os mais afetados. A TAB. VI apresenta o número de leitões mortos.

TABELA VI - Mortalidade de leitões após o desafio por causas indeterminadas, segundo os sub-grupos e faixas etárias

Faixa etária	Sub-grupos					
	A_1	A_2	B_1	B_2	C_1	C_2
Do desafio até 35 dias	8/45	5/14	11/51	1/18	4/49	0/18
De 35 dias ao abate	6/37	2/9	12/40	1/17	12/45	1/18
Total	14	7	23	2	16	1

Numerador : nº de animais mortos

Denominador: Nº total de animais

4.7.1. Sinais clínicos

As TAB. VII, VIII, IX, X e XI apresentam a ocorrência dos sintomas de secreções mucosas e purulentas, espirro, hemorragia nasal e dificuldade respiratória nos sub-grupos desafiados e não desafiados.

A secreção mucosa ocorreu em altas percentagens nos sub-grupos C_1 e B_1 , aos 28 e 56 dias e em baixas percentagens aos 28 dias nos sub-grupos C_2 , B_2 e A_2 não desafiados. Aos 56 dias, foi a época em que ocorreu maior percentagem nos sub-grupos desafiados, apresentando C_1 com 92,10%, B_1 com 87,87% e A_1 com 46,87%. Nos sub-grupos não desafiados, o pique ocorreu aos 120 dias, com C_2 apresentando 58,82%; B_2 35,29% e A_2 , 42,85%.

Todos os animais dos sub-grupos desafiados apresentaram altas percentagens de espirros, aos 28 e 56 dias, ocorrência idêntica no sub-grupo B_2 não desafiado.

Hemorragia nasal nos sub-grupos desafiados foi elevada em comparação com os sub-grupos não desafiados. Nestes, não ocorreu hemorragia até os 56 dias. Nos sub-grupos A_2 e C_2 , a hemorragia permaneceu sem manifestação até os 90 dias.

Ocorreu baixa manifestação de dificuldades respiratórias, exceto no sub-grupo C_1 , onde, aos 28 dias, 54,76% dos animais manifestaram o sintoma. No sub-grupo A_2 não foi registrado este sinal em nenhuma das observações.

Secreção purulenta foi observada primeiro nos sub-grupos desafiados C_1 e B_1 , aos 56 dias. Nos sub-grupos não desafiados, a secreção purulenta somente foi registrada aos 120 dias de idade.

4.7.2. Isolamento nasal de *B. bronchiseptica*

A TAB. XII apresenta a percentagem de isolamento de *B. bronchiseptica* nos sub-grupos C_1 , B_1 e A_1 desafiados.

TABELA VII - Ocorrência de secreção mucosa nos suínos dos sub-grupos desafiados e não desafiados, em diferentes faixas etárias

Sub- grupos	Idade em dias												Total	
	28	56	90	120	150	180	180	180	180	180	180	180		
C ₁	57/42	88,09	35/38	92,10	10/58	26,31	22/37	59,45	15/34	44,11	16/32	50,00	135/221	61,08
B ₁	25/39	64,10	29/33	87,87	6/33	18,18	2/51	6,45	4/30	13,33	10/28	35,71	76/194	39,17
A ₁	18/37	48,64	15/32	46,87	6/31	19,35	6/31	19,35	13/31	41,95	8/31	25,80	66/195	34,19
C ₂	0/18	-	15/18	83,33	8/17	47,05	10/17	58,82	6/17	35,29	6/17	35,29	45/104	43,26
B ₂	1/17	5,88	8/17	47,05	0/17	-	6/17	35,29	5/17	29,41	8/16	50,00	28/101	27,72
A ₂	2/9	22,22	1/8	12,50	0/7	-	3/7	42,85	5/7	71,42	2/7	28,57	13/45	28,88

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

TABELA VIII - Ocorrência de espirros nos suínos nos subgrupos desafiados e não desafiados, em diferentes faixas etárias

Sub- grupos	Idade em dias										Total	%		
	28	56	90	120	150	180	210	240	270	300				
C ₁	24/42	57,14	55/58	86,84	1/58	2,65	8/57	21,62	5/54	14,70	3/32	9,37	74/221	35,48
B ₁	57/59	94,87	52/53	96,96	0/53	-	7/51	22,58	4/50	15,53	5/28	17,85	85/194	45,81
A ₁	55/57	89,18	7/52	21,87	5/51	9,67	8/51	25,80	1/51	3,22	1/51	3,22	55/195	27,46
C ₂	0/18	-	4/18	22,22	5/17	29,41	0/17	-	1/17	5,88	0/17	-	10/104	9,61
B ₂	17/17	100	14/17	82,55	0/17	-	4/17	25,52	2/17	11,76	3/16	18,75	40/101	39,60
A ₂	0/9	-	0/8	-	1/7	14,28	1/7	14,28	1/7	14,28	0/7	-	3/45	6,66

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

TABELA IX - Ocorrência de hemorragia nasal em suínos dos sub-grupos desafiados e não desafiados, em diferentes faixas etárias

Sub-grupos	Idade em dias										Total	%		
	28	56	90	120	150	180	180	180	180	180				
C ₁	13/42	30,95	7/38	18,42	2/38	5,26	6/57	16,21	6/34	17,64	2/52	6,25	36/221	16,28
B ₁	8/59	20,51	12/55	36,36	6/55	18,18	9/51	29,05	14/50	46,66	14/28	50,00	65/194	52,47
A ₁	6/57	16,21	10/52	31,25	18/51	58,06	14/51	45,16	14/51	45,16	15/51	41,93	75/193	58,86
C ₂	0/18	-	0/18	-	0/17	-	5/17	17,64	1/17	5,88	2/17	11,76	6/104	5,76
B ₂	0/17	-	0/17	-	2/17	11,76	2/17	11,76	4/17	23,52	2/16	12,50	10/101	9,90
A ₂	0/9	-	0/8	-	0/7	-	1/7	14,28	1/7	14,28	1/7	14,28	5/45	6,66

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

TABELA X - Manifestação de dificuldade respiratória nos suínos dos sub-grupos desafiados e não desafiados, em diferentes faixas etárias

Sub- grupos	Dias após o nascimento											Total	%	
	28	%	56	%	90	%	120	%	150	%	180			%
C ₁	25/42	54,76	2/38	5,26	0/58	-	0/57	-	1/54	2,94	0/52	-	26/221	11,76
B ₁	1/59	2,56	1/55	5,05	0/55	-	2/51	6,45	4/50	15,53	0/28	-	8/194	4,12
A ₁	1/57	2,70	0/52	-	5/51	16,12	3/51	9,67	1/51	3,22	1/28	3,57	11/195	5,69
C ₂	0/18	-	1/18	5,55	0/17	-	0/17	-	0/17	-	0/17	-	1/104	0,96
B ₂	0/17	-	0/17	-	0/17	-	1/17	5,88	0/17	-	0/16	-	1/101	0,99
A ₂	0/9	-	0/8	-	0/7	-	0/7	-	0/7	-	0/7	-	0/45	-

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

TABELA XI - Presença de secreção purulenta nos suínos dos sub-grupos desafiados e não desafiados, em diferentes faixas etárias

Sub- grupos	Dias após o nascimento											Total	%
	28	56	90	120	150	180	210	240	270	300	330		
C ₁	0/42	8/58	1/38	2,65	5/57	15,51	0/34	-	1/32	3,12	15/221	6,78	
B ₁	0/59	1/55	0/55	-	10/51	52,25	7/50	25,55	7/28	50,00	25/194	12,88	
A ₁	0/57	0/52	9/51	29,05	7/51	22,58	6/51	19,55	9/51	29,05	51/195	16,06	
C ₂	0/18	0/18	0/17	-	4/17	25,52	5/17	17,64	1/17	5,88	8/104	7,69	
B ₂	0/17	0/17	0/17	-	0/17	-	1/17	6,25	4/16	25,00	5/101	4,95	
A ₂	0/9	0/8	0/7	-	1/7	14,28	0/7	-	1/7	14,28	2/45	4,44	

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

Aos 28 dias ocorreu a maior percentagem de isolamento nos três sub-grupos. O sub-grupo C_1 foi o de maior percentagem de isolamento, seguido do B_1 . A_1 apresentou a menor percentagem de isolamento. Observou-se uma tendência cíclica decrescente de *B. bronchiseptica* nos três sub-grupos.

A TAB. XIII apresenta a percentagem de isolamento de *B. bronchiseptica* nos sub-grupos C_2 , B_2 e A_2 , não desafiados. Nos sub-grupos C_2 e B_2 ocorreram isolamentos decrescentes aos 10 e 28 dias; aos 56 e 90 dias, o isolamento foi nulo, nos respectivos sub-grupos. Ocorreu um recrudescimento aos 120 dias (88,23 e 82,35%), em ambos os sub-grupos, que coincidiu com a época de aumento nos respectivos sub-grupos desafiados. A descontaminação nasal em B_2 foi mais rápida do que em C_2 . No sub-grupo A_2 , somente a partir dos 56 dias, foi possível isolar o agente nas cavidades nasais dos leitões. Os isolamentos dos sub-grupos A_2 foram percentualmente menores que nos outros sub-grupos.

A média do número de colônias por colheita nos sub-grupos consta da TAB. XIV.

A TAB. XV apresenta os índices acumulados dos sinais clínicos e isolamento nasal de *B. bronchiseptica*.

4.7.3. Titulação de anticorpos

O título médio de anticorpos séricos e a respectiva frequência de cada tratamento, segundo a colheita, constam da TAB. XVI. Aos sete dias de idade, o título médio nos sub-grupos A_1 e A_2 foi de 1:354,66 e 1:365,33, respectivamente; nos demais sub-grupos foi de zero. Aos 28 dias, em A_1 e A_2 registraram-se médias de títulos de 1:73,82 e 1:64,44. Aos 56 dias, as médias elevaram-se para 1:118,96 e 1:112,50 e nos sub-grupos B_1 e B_2 , para 1:211,87 e 1:53,52, respectivamente.

A partir dos 90 dias, inclusive, os sub-grupos A_1 e A_2 ; B_1 e B_2 apresentaram quedas nos títulos, de colheita para colheita. No sub-grupo C_1 , os maiores títulos

ocorreram aos 90 e 120 dias, com índice de 1:11,57 e 1:11,35. No sub-grupo C₂, o maior título foi de 1:9,41, aos 120 dias.

Nos sub-grupos desafiados A₁ e C₁ houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias, aos sete, 28 e 56 dias; A₁ e B₁, aos sete dias e B₁ e A₁ aos 56 dias; B₁ e C₁, aos 56 e 90 dias e B₁ e B₂, aos 56 dias. Nos sub-grupos não desafiados houve diferença entre A₂ e C₂, aos sete e 56 dias e A₂ e B₂, aos sete dias.

Os leitões da porca 417 somente apresentaram título a partir do 28º dia.

4.7.4. Pesagem dos animais

A TAB. XVII apresenta o peso médio dos sub-grupos ao nascimento, à desmama, aos 56, 150 e 180 dias. A análise de variância entre médias de peso ($P < 0,05$) dos sub-grupos apurou que, ao nascimento e à desmama, não ocorreu diferença significativa. Entre A₁ e C₁ ocorreu diferença a partir dos 56 dias e aumentou nas outras pesagens. Entre A₂ e A₁, C₂ e C₁, B₁ e C₁, A₂ e B₂ ocorreu diferença significativa aos 150 e 180 dias. Aos 150 dias, ocorreu entre B₁ e A₁, B₁ e B₂ e aos 180 dias, entre A₂ e C₂. O GRAF. 1 apresenta as curvas de crescimento dos sub-grupos.

TABELA XII - Percentual de isolamento de *B. bronchiseptica* através de "swabbs" nasais e cultivo em G20G, dos suínos dos sub-grupos desafiados, no período pós-parto

Sub-grupos	Dias após o nascimento												Total	%		
	10	28	56	90	120	150	180	180	180	180	180	180				
A ₁	18/45	40,00	26/37	70,27	12/32	57,50	9/31	29,00	7/31	22,58	13/31	41,93	17/31	54,85	102/238	42,85
B ₁	*	-	24/39	61,53	12/33	56,56	12/33	56,36	19/31	61,29	7/30	23,33	7/28	25,00	81/194	41,75
C ₁	19/46	41,30	37/42	88,09	16/38	42,10	12/38	31,57	21/37	56,75	15/34	44,11	22/32	68,75	142/267	53,18

* Não foi colhido "swabb"

TABELA XIII - Percentual de isolamento de *B. bronchiseptica* através de "swabbs" nasais e cultivo em G20G dos suínos dos sub-grupos não desafiados, no período pós-parto

Sub-grupos	Dias após o nascimento												Total	%		
	10	28	56	90	120	150	180	180	180	180	180	180				
C ₂	3/18	16,66	3/18	16,66	0/18	-	1/17	5,88	15/17	88,23	1/17	14,28	9/17	52,94	32/122	27,22
B ₂	4/17	23,52	2/17	11,76	1/17	5,88	0/17	-	14/17	82,35	14/17	82,35	5/16	31,25	40/118	33,89
A ₂	0/14	-	0/9	-	5/8	57,50	2/7	28,57	1/7	14,28	5/7	71,42	1/7	14,28	12/59	20,33

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

TABELA XIV - Número médio de colônias de *B. bronchiseptica* isoladas em G20G, nos suínos dos sub-grupos desafiados e não desafiados

Sub-grupos	Dias após nascimento						
	10	28	56	90	120	150	180
A ₁	307,16	148,88	60,83	117,33	32,57	178,92	155,35
B ₁	**	86,54	117,83	141,08	179,15	104,14	180,71
C ₁	**	107,81	81,18	159,50	254,33	86,40	215,00
A ₂	-	-	30,00	55,00	10,00	24,80	15,00*
B ₂	**	0,82	30,00	-	273,64	115,35	30,20
C ₂	**	10,00	-	500,00*	272,73	500,00	20,55

* Isolou-se de apenas um animal

** Não foi realizada a contagem de colônias

TABELA XV - Ocorrência acumulada de sinais clínicos e isolamento de *B. bronchiseptica*, nos sub-grupos desafiados e não desafiados, durante o período de observação

Sub-grupos	Secreção mucosa	%	Espir-ros	%	Hemorragia nasal	%	Dificuldade respiratória	%	Secreção purulenta	%	Isolamento nasal <i>B. bronchiseptica</i>	%
C ₁	135/221	61,08	74/221	33,48	36/221	16,28	26/221	11,76	15/221	6,78	142/267	53,18
B ₁	76/194	39,17	85/194	43,81	65/194	33,51	8/194	4,12	25/194	12,88	81/194	41,75
A ₁	66/195	33,85	55/195	28,21	75/195	38,46	11/195	5,64	31/195	15,89	102/238	42,85
C ₂	45/104	43,27	10/104	9,62	6/104	5,77	1/104	0,96	8/104	7,69	52/122	42,62
B ₂	28/101	27,72	40/101	39,60	10/101	9,90	1/101	0,99	5/101	4,95	40/118	33,89
A ₂	15/45	33,33	5/45	11,11	3/45	6,66	0/45	0	2/45	4,44	12/59	20,34

Numerador : nº de animais positivos

Denominador: nº total de animais

TABELA XVI - Título aglutinante médio contra *B.bronchiseptica*, no soro dos animais dos sub-grupos desafiados e não desafiados, após o nascimento

Sub-grupos		7	28	56	90	120	150	180
A ₁	\bar{X}	354,66	73,82	118,96	57,74	24,83	15,48	9,67
	n	45	37	32	31	31	31	31
A ₂	\bar{X}	365,33	64,44	112,50	15,71	5,71	11,42	8,57
	n	14	9	8	7	7	7	7
B ₁	\bar{X}	-	37,75	211,87	70,96	35,48	18,62	10,00
	n	48	39	33	33	31	30	28
B ₂	\bar{X}	-	14,11	53,52	31,25	17,50	10,62	5,00
	n	17	17	17	17	17	17	16
C ₁	\bar{X}	-	3,11	1,51	11,57	11,35	5,88	6,06
	n	46	42	38	38	37	34	32
C ₂	\bar{X}	-	-	1,66	1,66	9,41	0,58	-
	n	18	18	18	17	17	17	17

n = número de animais sangrados

TABELA XVII - Peso médio em kg dos leitões nos sub-grupos, submetidos a diferentes tratamentos, durante o período pós-parto

Sub-grupos	Idade em dias				
	1	35	56	150	180
A ₁	1,138	5,782	11,984	55,482	75,812
A ₂	1,443	4,722	10,114	67,507	89,000
B ₁	1,116	5,718	10,703	58,884	76,131
B ₂	0,735	6,800	12,252	62,375	76,681
C ₁	1,082	5,009	9,786	51,350	69,693
C ₂	0,905	6,622	11,072	64,429	79,505
\bar{X}	1,069	5,775	10,985	60,004	77,803

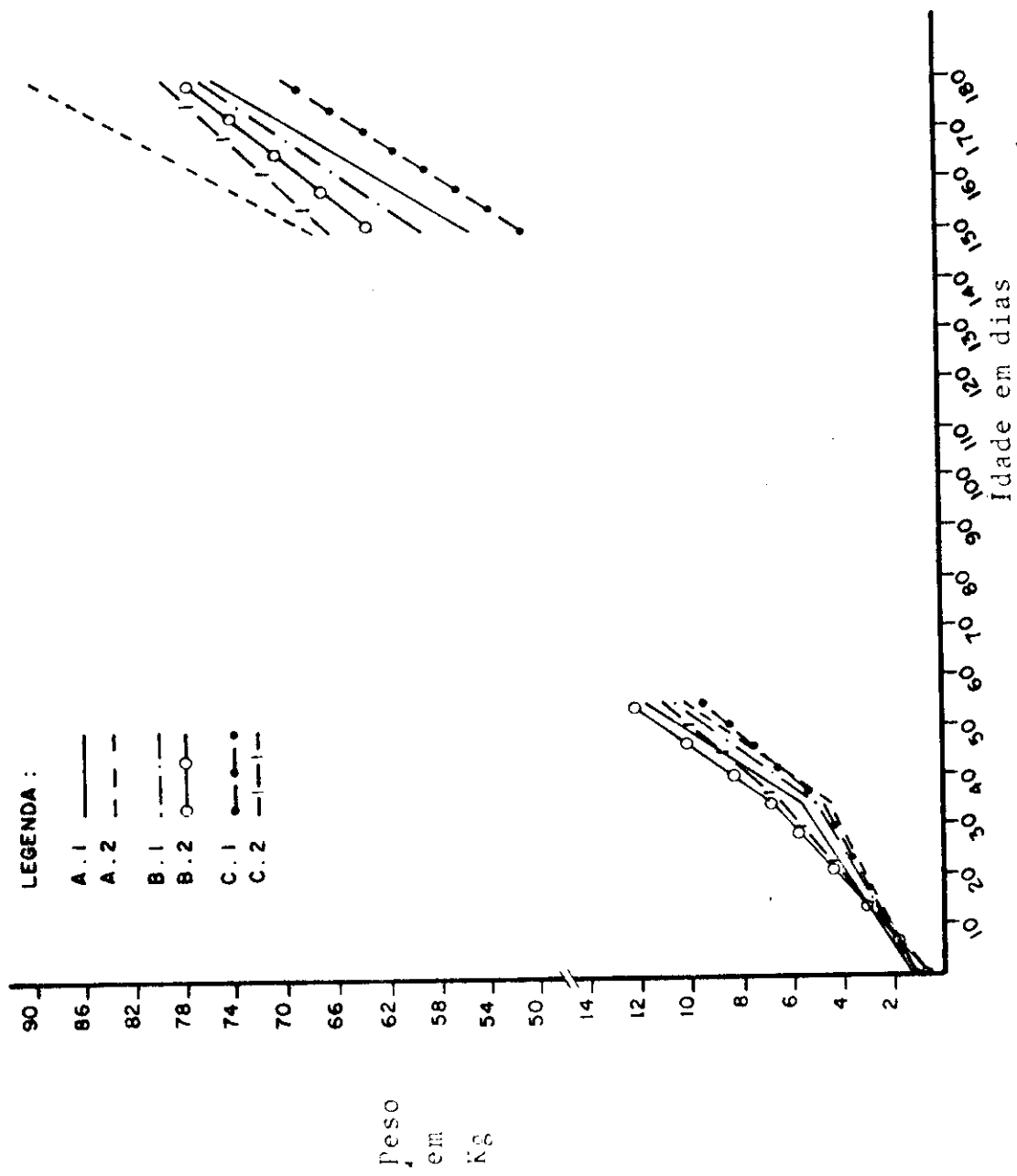


GRÁFICO 1 - Peso médio em kg dos leitões nos sub-grupos submetidos a diferentes tratamentos durante o período pós-parto

5. DISCUSSÃO

No isolamento das quatro amostras de *B. bronchiseptica* nos casos clínicos a nível de campo, foi difícil reconhecer as colônias pela coloração marron-acinzentada, já que outras bactérias também apresentaram colônias com coloração semelhante. Estes achados discordam parcialmente da afirmação de ROSS et alii (1963a), de que o ágar Mac Conkey com 1% de glicose é um meio seletivo para isolamento da *B. bronchiseptica* e que, após 48 horas de incubação, as colônias típicas de *B. bronchiseptica* eram marron-acinzentadas, com o centro escuro e mediam 2 a 3 mm de diâmetro. HARRIS et alii (1969) e KOSHIMIZU et alii (1973a,b), utilizaram a mesma técnica para isolamento de *B. bronchiseptica*. Neste trabalho, além da coloração não ser exclusiva das colônias de *B. bronchiseptica*, o meio permitia, também, o crescimento de inúmeras outras espécies de bactérias, fungos e leveduras. Algumas destas espécies apresentavam crescimento rápido e invasor, sobrepujando as colônias de *B. bronchiseptica* que, quando se localizavam ao lado de bactérias acidificantes, mudavam as características de coloração e tamanho.

Na caracterização bioquímica, as amostras comportaram-se como aquelas achadas por ROSS et alii (1963a,b) e

HARRIS et alii (1969).

Para evidenciar mais uma das características da *B. bronchiseptica*, julgou-se oportuno realizar o exame de motilidade em lâmina no microscópio de contraste de fase.

As amostras apresentaram-se hemolíticas, em ágar sangue de cavalo ou carneiro, concordando com ELDERING (1941) e ROSS et alii (1963b). Apresentaram, ainda, branco-acinzentadas, ovóides, mucóides, o que possibilitou classificá-las como em fase I, de acordo com KANG et alii (1970).

A coloração, pela técnica de BAKER (1970), para evidenciação da cápsula, mostrou-a bem nítida e espessa, achado que foi utilizado também para identificar a fase I, segundo ELDERING (1941) e JENKINS (1978). As amostras puderam ser enquadradas na fase I e, como esta é a fase antigênica, segundo JENKINS (1978) e YOKOMIZO & SHIMIZU (1979), elas foram escolhidas para a produção da bacterina.

A vacina foi produzida pelo crescimento de *B. bronchiseptica*, em infusão de cérebro e coração, com 2% de soro de bezerro, sob agitação constante, por 24 horas, a 37°C. Esta técnica difere de BRANDENBURG (1978), que utilizou 1% de soro fetal bovino e não agitou o caldo para o crescimento, deixando-o incubado por 48 horas. A agitação propiciou o crescimento rápido de *B. bronchiseptica*, atingindo um título médio de 1×10^{10} bactérias/ml. KOSHIMIZU et alii (1973a) alcançaram título de 1×10^9 bactérias, após 18 horas a 37°C, sob agitação em "tripto-soy-broth". O título médio, neste trabalho, sem agitação e incubação por 48 horas, foi de 5×10^7 , e está de acordo com BRANDENBURG (1978). O título da cultura de 24 a 36 horas, em gema de ovo embrionado de seis dias de idade, foi de 5×10^7 bactérias/ml (HARRIS & SWITZER, 1968).

Outros trabalhos adotaram a produção da vacina em diferentes meios sólidos. Assim, HARRIS & SWITZER (1972) cultivaram *B. bronchiseptica* em garrafas de Roux, contendo "tryptose blood agar base" com sangue, por 48 horas. En-

quanto KOSHIMIZU et alii (1973b) utilizaram idêntico procedimento, por 24 horas e 10% de sangue eqüino, já NAKASE et alii (1976) utilizaram placas de "Bordet-Gengou's" por 18 horas e BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977) usaram garrafas de Roux com "bouillon agar" e incubadas por 48 horas. O título da cultura, ao final de apenas 24 horas, as facilidades de manuseio, principalmente em relação à vidraria e aos equipamentos empregados, a necessidade de apenas uma pessoa e um curto tempo, constituem as vantagens desta técnica, sobre aquelas que utilizaram meios sólidos na produção da vacina.

A adição de soro permitiu que a cultura de *B. bronchiseptica* permanecesse na fase I, após o tempo de cultivo, o que está de acordo com ELDERING (1941), BRANDENBURG (1978) e JENKINS (1978). *B. bronchiseptica* em fase I induz a uma maior resposta imunitária (OGATA et alii, 1973). Antissoro para fase III possui altos títulos aglutinantes para organismos homólogos, mas nenhuma aglutinação para organismos na fase I (YOKOMIZO & SHIMIZU, 1979). Segundo JENKINS (1978), o antígeno imunogênico provavelmente se localiza na superfície da célula e está associado com o antígeno capsular.

Quanto ao teste de potência em camundongos, os resultados obtidos, nesta pesquisa, foram superiores aqueles fixados por GOODNOW et alii (1977) que estabeleceram os limites do teste de avaliação de bacterinas de *B. bronchiseptica* para RAI, embora não determinassem o título de desafio usado nos camundongos. Neste trabalho utilizou-se 100 DL₅₀/0,2 ml como desafio, o que correspondeu a um inóculo de $6,6 \times 10^7$ bactérias. ELDERING (1941) observou que o título variava de 1 a 4×10^7 bactérias/0,5 ml para a DL₅₀. As amostras utilizadas no desafio eram de alta letalidade para camundongos, quando se compara com o título do DL₅₀ de ELDERING (1941). A alta letalidade pode ser ainda constatada no pequeno período clínico da doença,

já que os camundongos morriam sempre no mesmo dia em que manifestavam-se doentes e a mortalidade após o desafio variou entre 24 e 72 horas.

Os sinais clínicos e as lesões macroscópicas, à necrópsia, coincidem com os observados por GOODNOW et alii (1977). O isolamento de *B. bronchiseptica*, em fase I do sangue cardíaco dos camundongos mortos, também está de acordo com ELDERING (1941).

A ausência de reações nas porcas e nos leitões vacinados com a bacterina coincide com HARRIS & SWITZER (1969, 1972), KOSHIMIZU et alii (1973b), NAKASE et alii (1976), GOODNOW (1977), BERCOVICH & OOSTERWOUDE (1977), BRANDENBURG (1978), GOODNOW et alii (1978) e GOODNOW et alii (1979). Entretanto, LONCAREVIC et alii (1979) afirmam que reações gerais ocorreram em 14% dos leitões vacinados e reações locais após a segunda vacinação. Essas reações poderiam se dever a uma concentração maior de formol na inativação da bacterina, ou presença de substâncias estranhas, possivelmente responsáveis por reações alérgicas. Nenhum trabalho relata reações nos animais vacinados.

Os títulos de anticorpos aglutinantes no soro das porcas dos grupos A, B e C, aos 60-70 dias e de B e C, aos 100 dias de gestação e aos sete dias pós-parto, são semelhantes aos observados por KANG et alii (1970, 1971), OGATA et alii (1973), KOSHIMIZU et alii (1973b), KEMENY & AMTOWER (1973), BERCOVICH & OOSTERWOUDE (1977) e JENKINS, (1978).

A vacinação das porcas do grupo A, conforme era esperado, elevou substancialmente o título de anticorpos séricos contra *B. bronchiseptica*. Aos 100 dias, o título médio do grupo estava em 1:420 e, aos sete dias pós-parto, 1:960, o que indica uma duplicação do título médio entre a primeira e segunda vacinação, caracterizando uma resposta secundária. KOSHIMIZU et alii (1973b) vacinaram duas porcas, subcutaneamente, aos 60 e 67 dias antes do parto, com 20 e

30 ml de cada vez, de uma vacina emulsionada em partes iguais, de suspensão bacteriana e adjuvante incompleto de Freund. O título de anticorpos séricos elevou-se a 1:5120 e 1:10240, à época do parto. NAKASE et alii (1976) produziram uma bacterina inativada por thimerosal e adsorvida em gel de hidróxido de alumínio e vacinaram porcas gestantes, aos 8 a 10 e 4 a 5 semanas antes do parto, com 10 ml de vacina. Os títulos de anticorpos séricos, no momento do parto, variaram de 1:2560 e 1:10240. BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977) vacinaram 11 porcas, aos 60 e 100 dias de gestação, com 1 ml, por via intramuscular; oito porcas responderam à vacinação primária e secundária, com títulos variando entre 1:500 e 1:1000 aos cinco dias pós-parto. Os títulos alcançados no presente trabalho foram inferiores aos de KOSHIMIZU et alii (1973b) e NAKASE et alii (1976); entretanto, o antígeno utilizado por eles parece que detectava títulos aglutinantes inespecíficos ou apresentava algum grau de auto-aglutinação, já que em porcas adultas não vacinadas e em leitões infectados naturalmente, os títulos eram bem superiores aos de JENKINS (1978) e aos obtidos neste experimento. O volume de vacina, inoculado, parece ter importância no título de anticorpos aglutinantes da resposta imunitária, pois os títulos obtidos por KOSHIMIZU et alii (1973b) e NAKASE et alii (1976) confirmam essa hipótese. Entretanto, os grandes volumes utilizados por eles são difíceis de se aplicar em animais adultos e não recomendáveis para recém-nascidos, por envolver doses de 10, 20 ou 30 ml e trazer-lhes problemas que poderiam mesmo ser mais sérios do que os causados pela RAI.

Neste experimento, a porca 417 não respondeu à vacinação. Fato idêntico ocorreu com BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977), que tiveram duas porcas que não responderam à primo-vacinação. Duas outras porcas (73 e 143) não responderam ao "booster", o que não era esperado. Dentre outras

possíveis explicações, estão o erro de vacinação, a troca de animal, a identificação errada, a deficiência genética do sistema imunitário da porca, ou o excesso de dose à primo-vacinação, conduzindo a uma paralisia imunológica.

O isolamento de *B. bronchiseptica*, nas porcas, atingiu a um máximo de 25%, aos 60 dias antes do parto e, após este, não se isolou em nenhum grupo o agente mencionado. As baixas percentagens de isolamento são semelhantes aos achados de FARRINGTON & SWITZER (1976), POWELL (1976), que afirmam estar entre 10 e 15% a percentagem de animais infectados no rebanho. BERCHOVICH & OOSTERWOOD (1977) relatam que, em rebanhos infectados ou saudáveis, as porcas poderiam ter títulos contra *B. bronchiseptica*, embora nenhum organismo pudesse ser encontrado na flora nasal mas, em muitos casos, *B. bronchiseptica* poderia ser isolada da traquéia. Isto dificulta a identificação microbiológica dos portadores, alterando os índices da prevalência e contribuindo ainda mais para a disseminação do agente dentro da população jovem, fato que poderia estar ocorrendo na granja selecionada para o presente trabalho.

O volume e título de *B. bronchiseptica*, contidos no inóculo são importantes na ocorrência e severidade das lesões de RAI. A idade ao desafio também é de grande importância, pois à medida que o animal aumenta a idade, diminuem as possibilidades de se reproduzir a doença, a recuperação é mais rápida e a severidade das lesões são menores (ROSS et alii, 1963b; DUNCAN et alii, 1966; HARRIS et alii, 1969; HARRIS & SWITZER, 1972; NIELSEN et alii, 1976; BERCHOVICH & OOSTERWOOD, 1977).

O volume do inóculo e a sua deposição, na cavidade nasal, ao desafio executado no presente trabalho, coincide com os autores adiante citados. Entretanto, o título do inóculo de 1×10^{10} ultrapassa os utilizados por eles, que foram de 5×10^7 bactérias (HARRIS & SWITZER, 1968 e BRANDENBURG, 1978). Uma cultura de 24 horas em ágar sangue

foi suspensa em um caldo à concentração de 1 mg/ml e 0,5 ml foi instilada na cavidade nasal dos leitões (SHIMIZU et alii, 1971). NAKAGAWA et alii (1974) utilizaram procedimento idêntico, mas depositaram 1 ml de suspensão. FETTER et alii (1975) instilaram 0,5 ml de caldo, com título 9×10^6 organismos/ml; KOSHIMIZU et alii (1973a) usaram 0,5 ml de um caldo com 10^9 organismos/ml. O título e a virulência das amostras utilizadas no desafio foram altos, o que resultou em doença clínica, nos sub-grupos desafiados. Acredita-se que, se o título fosse menor, animais dos sub-grupos A_1 e B_1 apresentariam uma percentagem maior de descontaminação nasal e índices menores de sinais clínicos, mesmo porque, em condições naturais, o leitão não está exposto a tão alta carga bacteriana. O título médio empregado no desafio em outros trabalhos foram inferiores a este, o que terá de ser levado em consideração, quando forem comparados os sinais clínicos, isolamento nasal de *B. bronchiseptica* e peso dos animais desafiados. A idade dos animais desafiados foi menor, em comparação a HARRIS & SWITZER (1968) e BRANDENBURG (1978).

A literatura disponível até o presente, menciona os sinais clínicos observados em suínos com RAI, durante um período de observação, geralmente curto e dando ênfase à observação de um só tipo de sintoma. Como desafiaram-se leitões com *B. bronchiseptica*, observam-se os sinais clínicos destes e dos sub-grupos não desafiados, até aos 180 dias, época do abate.

A secreção mucosa ocorre normalmente em animais sadios; entretanto, quando ocorre um processo traumático ou infeccioso essa secreção é aumentada pela irritação provocada. O aumento foi observado nos orifícios externos do nariz dos suínos e em volta do algodão dos "swabbs" que, ao serem retirados das cavidades nasais, apresentavam-se embebidos em grandes quantidades de secreção mucosa. Esses achados concordam com DUNCAN et alii (1966), que encontra-

ram, após duas semanas da instilação de *B. bronchiseptica*, uma grande quantidade de exsudato. Nos animais vacinados, principalmente nos dos sub-grupos A, ocorreu, em menor número, a manifestação de excesso de muco em virtude de a vacina ter aumentado a taxa de descontaminação de *B. bronchiseptica* na cavidade nasal, pelo nível de anticorpos induzidos, eliminando a causa da secreção e um maior número de animais que resistiram à infecção, em face da vacinação.

Para SWITZER & FARRINGTON (1979), o primeiro sintoma em RAI é o espirro. Os espirros nos animais dos sub-grupos desafiados ocorreram em altas percentagens, aos 28 e 56 dias, quando então declinaram até o final. O sub-grupo A₁ manifestou menores percentagens de animais com espirros. Nos animais dos sub-grupos não desafiados, as percentagens foram bem menores; assim é que, até os 56 dias, inclusive, não foi observado espirro nos animais de A₂.

Duas a três semanas após a incubação, ROSS et alii (1963b) observaram as maiores incidências de espirros, que sempre foram leves. NAKAGAWA et alii (1974) obtiveram os mesmos resultados, mas os animais não apresentaram sintomas com desvio e retração nasal. KOSHIMIZU et alii (1973b) observaram espirros em leitões entre a 4a. e 10a. semanas, o que, em parte, coincide com a ocorrência nos sub-grupos desafiados, que receberam uma alta carga bacteriana, e por isso uma maior distensão do período clínico. No sub-grupo A₂ foi observado este sinal em um animal, somente aos 90 dias, o que se pode creditar ao efeito da vacinação, que impediu a implantação da *B. bronchiseptica* na cavidade nasal, na fase inicial da vida.

Com o avançar das lesões, puderam ser vistas raias de sangue ou até mesmo profusa hemorragia nos exsudatos nasais. Isto se deu em virtude do rompimento de pequenos vasos superficiais, que ficavam expostos e, consequentemente, mais sensíveis a traumatismos, pois a hemor-

ragia espontânea é comum nos casos mais graves. Observou-se que em animais aparentemente normais não se verificava hemorragia, após a retirada do "swabb" das fossas nasais; entretanto, quando os animais apresentavam sinais bem definidos e desenvolvidos de RAI, havia ocorrência de hemorragia, após a introdução do "swabb" nas fossas nasais, confirmando, em parte, os achados de SWITZER & FARRINGTON (1975). Animais dos sub-grupos C₂ e A₂ não manifestaram este sinal clínico até aos 120 dias, indicando que as lesões foram mais leves nesses sub-grupos.

Dificuldade respiratória, ao que parece, ocorre em função do excesso de exsudato nasal, complicado nesses casos pelo edema da membrana mucosa que levam à diminuição do orifício para a passagem do ar. A ocorrência de animais com dificuldades respiratórias foi nula no sub-grupo A₂, sendo baixa nos outros sub-grupos não desafiados. Nos sub-grupos desafiados, apesar da baixa frequência, como um todo, manifestou-se em 54,76% dos suínos do sub-grupo C₁, aos 28 dias. Dos animais vacinados em A₁, somente um apresentou o sinal, até aos 56 dias. Essas frequências são posteriores aos picos de secreção mucosa e espirro deste e dos outros sub-grupos. JONG et alii (1976) afirmam que a RAI se caracteriza por constantes espirros e fungar fanhoso, há presença de nariz dilatado e inchado nos estágios iniciais da doença, entre outros sintomas observados, o que também se verificou neste trabalho.

SWITZER & FARRINGTON (1975) afirmam que uma pequena quantidade de exsudato mucoso ou mesmo purulento frequentemente é descarregado do nariz em seguida ao espirro, o que se verificou neste experimento. Entretanto, alguns animais apresentaram grandes quantidades de exsudato purulento que, com o espirro, eram lançados como uma placa purulenta. Muitos "swabbs" eram envolvidos por essa secreção. Somente um animal do sub-grupo A₂ manifestou exsudação aos 120 e 180 dias. Nos sub-grupos desafiados, B₁ e C₁, já aos

56 dias, este sinal já poderia ser observado. KOSHIMIZU et alii (1973a), relataram a ocorrência de secreção purulenta entre a 4a. e 10a. semanas, portanto, em idade mais precoce do que as observadas nesta pesquisa.

Os sinais clínicos descritos no presente estudo são semelhantes aos relatados por GUERREIRO et alii (1962), segundo os quais animais com RAI revelaram espirros seguidos de epistaxia, dificuldade respiratória, dispnéia, tosse e coriza com descargas nasais claras ou muco-purulentas.

Analisando as tabelas de sinais, observa-se que nos sub-grupos desafiados, em geral os animais vacinados apresentaram menores frequências de sinais clínicos. Ocorrências similares são observadas nos sub-grupos não desafiados. Estes resultados coincidem com GOODNOW (1977) e GOODNOW et alii (1979), que observaram redução dos sintomas clínicos em animais vacinados, comparados aos não vacinados.

O isolamento de *B. bronchiseptica*, diretamente das cavidades nasais de suínos, pode ser realizado por técnicas diversas; uma das mais empregadas é a de ROSS et alii (1963a) que vem sofrendo pequenas modificações, mas a parte básica permanece a mesma, sendo utilizado o ágar MacConkey com 1% de glicose. Recorreu-se a esse procedimento na fase inicial de isolamento de casos clínicos a nível de campo e levantamento em granjas, para seleção daquela onde seria implantado o presente trabalho. Em face das dificuldades encontradas nessa fase, com o uso do ágar MacConkey, passou-se então a usar o meio G20G, que é seletivo para *B. bronchiseptica* (SMITH & BASKERVILLE, 1979), mantendo-se os demais procedimentos de ROSS et alii (1963a) e HARRIS et alii (1969), SWITZER & FARRINGTON (1972) afirmam que a técnica de "swabb" é capaz de detectar entre 75 e 90% dos animais positivos para *B. bronchiseptica*, e esta pode ser demonstrada em altas taxas na cavidade nasal de suínos de até três meses de idade, infectados natural ou experimen -

talmente (ROSS et alii, 1965b; HARRIS et alii, 1969; KANG et alii, 1971; SHIMIZU et alii, 1971; HARRIS & SWITZER, 1972). JENKINS (1978) menciona fatores que podem contribuir para a baixa percentagem de isolamento, tais como, contaminação dos "swabbs" nasais à época da colheita, grande resistência de animais velhos à infecção e o uso de medicamentos na ração. Não se observou a participação dos dois últimos fatores e, com relação ao primeiro, conseguiu-se reduzir ao mínimo a contaminação, através da limpeza prévia com álcool dos orifícios externos das fossas nasais e a refrigeração após colheita, impediu um crescimento acentuado dos contaminantes. BRANDENBURG (1978) afirma que a enumeração de organismos de *B. bronchiseptica* obtidos pelo "swabb" em suínos vivos é matéria sujeita à variação, mas uma contagem mais apurada pode ser obtida da mucosa nasal de animal morto. No animal vivo, vários fatores interferem no sentido de impedir que se faça um bom "swabb", Estes fatores são: comprimento do estilete, grande diâmetro do "swabb", principalmente em animal novo, e má contenção do animal. Procurou-se padronizar as medidas do "swabb" e realizar uma boa contenção e uma inserção nasal até a metade do comprimento do nariz, em todos os animais. A quantidade de meio de transporte também favoreceu a uma padronização entre os "swabbs" e uma contagem mais real. Os resultados de isolamento e contagem nos diversos sub-grupos confirmam e dão crédito a este procedimento.

Suínos dos sub-grupos A foram desafiados mais precocemente do que os outros sub-grupos. Nas TAB. XII, XIII e XIV nota-se que, nos sub-grupos desafiados, a *B. bronchiseptica* implantou na cavidade nasal em altas concentrações, mesmo em A₁, que apresentava altos níveis de anticorpos séricos, confirmando, assim, os trabalhos de HARRIS & SWITZER (1969 e 1972), KOSHIMIZU et alii (1975b), NAKASE et alii (1976). O número de animais afetados no sub-grupo C₁ foi maior que em B₁ e A₁; entretanto, os índices de C₁ são inferiores a-

queles observados por SWITZER & FARRINGTON (1972) que, em 30 animais infectados artificialmente, quando atingiram 3, 4, 5 e 6 meses de idade, apresentavam-se com 27, 28, 26 e 25 animais com infecção, respectivamente, mas a média de colônias coincidiu aos 90 e 150 dias. Em A_1 ocorreu uma descontaminação intensa, até aos 120 dias (TAB. XIV), suplantando os resultados de HARRIS & SWITZER (1972) e confirmando os achados de NAKASE et alii (1976), que afirmam ainda que, em animais infectados, a vacina aumentou a taxa de descontaminação da cavidade nasal, mas quando a infecção ocorreu antes da 3a. semana de vida (caso presente), a vacina não reduziu a atrofia dos cornetos, não sendo mencionado em que idade foi feito o exame dos suínos. Animais do sub-grupo B_1 apresentaram-se intermediários entre A_1 e C_1 , sugerindo que o esquema de vacinação propiciou uma condição de reação inferior a A_1 e superior a C_1 , principalmente na descontaminação da cavidade nasal.

Nos sub-grupos não desafiados, A_2 permaneceu até aos 28 dias sem isolamento, evidenciando marcada resistência contra a infecção por *B. bronchiseptica*, fato que não ocorreu em B_2 e C_2 . Esses resultados confirmam e superam os encontrados por KOSHIMIZU et alii (1973b). Pelo manejo adotado na granja, os sub-grupos não desafiados ficaram em baias ao lado das ocupadas pelos sub-grupos desafiados, separados por paredes de, aproximadamente, 80 cm de altura e, portanto, expostos a um desafio constante pelo meio ambiente. NAKASE et alii (1976) observaram que a imunização passiva pelo colostro preveniu a infecção por *B. bronchiseptica*, em leitões até a 2a. ou 3a. semanas de vida, não evitando, entretanto, a infecção após a desmama ou na fase de crescimento. Para BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977), é importante proteger o leitão até a 4a. semana de vida contra o desafio ambiental, numa granja contaminada.

O esquema de imunização empregado, principalmente em A_2 , possibilitou diminuir o número de animais in-

fectados e a média de colônias, baixando a pressão exercida pela infecção. Já o esquema de vacinar somente os leitões, é impróprio pois o período negativo da vacina possibilita a implantação de *B. bronchiseptica* na cavidade nasal, antes da 4a. semana, o que leva a sérias consequências, quanto à RAI, ao peso dos animais e à presença de infecções pulmonares, não cumprindo com seus objetivos primários.

As técnicas usadas para detectar anticorpos séricos contra *B. bronchiseptica* são variadas, não tendo sido estabelecido, até o presente, um modelo padronizado. HARRIS & SWITZER (1969) foram os primeiros a identificarem anticorpos séricos induzidos por bacterina de *B. bronchiseptica* em suínos, mas não revelam a metodologia utilizada. KANG et alii (1970) utilizaram o método "bouillon" que usa culturas vivas e recentes de *B. bronchiseptica* como antígeno. Antígeno cultivado em meios sólidos ou líquidos, inativado por formol ou thimerosal, períodos de incubação da reação de 30 minutos a quatro horas, à temperatura de 36 ou 56 °C foram utilizados por SHIMIZU et alii (1971), HARRIS & SWITZER (1972), KEMENY & AMTOWER (1973), OGATA et alii (1973), KOSHIMIZU et alii (1973a,b). Após análise destas técnicas, decidimos utilizar a técnica preconizada por JENKINS (1978). Animais com infecção natural responderam fracamente (KANG et alii, 1970; KEMENY, 1973) e, segundo JENKINS (1978), a resposta nestes casos pode estar associada à IgM, portanto, de memória e vida de curta duração. Animais vacinados com bacterinas de *B. bronchiseptica* apresentam boa resposta imunitária. HARRIS & SWITZER (1969) induziram títulos de 1:128 a 1:256, após três doses de 3,0 ml intramuscular. KOSHIMIZU et alii (1973b) utilizaram também três doses de 5, 10 e 20 ml subcutâneo, em suínos de 15 semanas, de uma vacina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. O nível de anticorpos aglutinantes elevou-se entre 1:10240 e 1:80000. Das médias de títulos de anticorpos aglutinantes,

constantes da TAB. XVI, observa-se que os sub-grupos A apresentam índices elevados aos sete dias pós-parto e B e C não apresentaram títulos indicando, portanto, transferência de anticorpos pelo colostro das porcas vacinadas. Resultados semelhantes foram obtidos por KOSHIMIZU et alii (1973b), NAKASE et alii (1976), BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977), PEDERSEN & BARFOD (1977) e BRANDENBURG (1978).

Aos 28 dias, os animais dos sub-grupos A apresentaram quedas nas médias dos títulos, enquanto em B ocorreu aumento em resposta à vacinação, aos sete dias de idade e C permaneceu inalterado. O decréscimo das médias de títulos em A foi muito rápido e acredita-se ter ocorrido interferência de imunização passiva com a 1ª vacina e o desafio. KOSHIMIZU et alii (1973b) relatam que o declínio de anticorpos passivos foi rápido e na 13ª semana o título variava entre 1:20 e 1:80. BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977) mencionam uma ligeira queda na média, após a 1ª vacinação. Em ambos os trabalhos, não ocorreu desafio. O aumento ocorrido em B confirma e é superior aos resultados de NAKASE et alii (1976), BERCOVICH & OOSTERWOUD (1977) e BRANDENBURG (1978) e inferior aos de KOSHIMIZU et alii (1973), LONCAREVIC et alii (1979) e GOODNOW et alii (1979). Estes, com exceção do último, utilizaram grandes doses de vacina; entretanto, os resultados da descontaminação e redução da doença clínica são semelhantes aqueles obtidos nesta pesquisa. A razão pela qual os anticorpos aglutinantes são detectáveis só mais tarde, ainda é desconhecida (KANG et alii, 1971). SHIMIZU et alii (1971) encontraram títulos de anticorpos entre 1:40 e 1:80 em suínos de três meses de idade, inoculados experimentalmente. KANG et alii (1970) afirmam que o primeiro aparecimento de anticorpos aglutinantes deu-se à 20ª semana, em suínos naturalmente infectados. BRANDENBURG (1978) não encontrou qualquer aumento no título de anticorpos séricos dos animais do grupo controle, durante 55 dias após o desafio. Em C₁, a média aos 90 e 120 dias foi de 1:11,57 e 1:11,35 e em C₂, de 1:9,41 aos 120 dias. Resposta

imunológica secundária em face à segunda vacinação, aos 28 dias, foi constatada, na média dos sub-grupos A e B, aos 56 dias. O título do sub-grupo B₁ superou A₁ e A₂, aos 56 dias. Isto ocorreu em virtude do somatório de vacina e infecção, já que B₂ foi bem inferior, tanto à B₁ como à A₁ e A₂. É importante observar em A₂ que, mesmo sem infecção, os animais mantiveram títulos tão altos quanto A₁ com infecção e mais do dobro B₂.

A análise estatística das diferenças entre as médias dos títulos de anticorpos séricos, nos sub-grupos, apontou, onde ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$). Ao nascimento, ocorreu diferença significativa entre os sub-grupos A e B, A e C; entretanto, nenhuma diferença ocorreu entre B e C, A₁ e A₂.

Aos sete, 28 e 56 dias, entre A₁ e C₁, houve diferença significativa. Aos 56 dias, entre A₂ e C₂, A₁ e C₁, B₁ e A₁, B₁ e C₁, que também manifestaram-se aos 90 dias, significativamente diferentes.

A RAI é uma das doenças que afeta a conversão e ganho de peso dos animais. SHUMAN & EARL (1956) ao estudarem o efeito econômico da RAI em rebanhos de suínos, verificaram que a média de peso de suínos normais, aos 56 e 140 dias de idade, excedia aos suínos afetados em 3,9 e 6,4%, respectivamente. A média de ganho de peso diário dos sadios era de 5,2% a mais que os doentes. HAMORI (1970) observou que suínos afetados por Rinite Atrófica e Pneumonia Enzoótica tiveram o período de engorda para atingir 120 kg aumentado para 9 a 16 meses, em 248 afetados, entre 811 suínos normais, que atingiram este índice em seis meses. KOSHIMIZU et alii (1973b) afirmaram que as perdas econômicas da RAI poderiam ser reduzidas consideravelmente pela prevenção do estabelecimento de *B. bronchiseptica* na cavidade nasal de suínos jovens. GOODNOW (1977) afirma que a vacinação melhorou a produção econômica. MUIRHEAD (1980)



afirma que as perdas econômicas provocadas pela Rinite Atrófica endêmica, em um rebanho de 100 matrizes, durante um ano, pode atingir US\$9.850.000.

O emprego de bacterinas para controlar as perdas econômicas da RAI, utilizados nesta pesquisa, baseou-se em trabalhos semelhantes de PEDERSEN & BARFOD (1977), GOODNOW et alii (1978), GOODNOW et alii (1979). O peso médio dos sub-grupos constam da TAB. XVII. À desmama, os animais vacinados, principalmente em A_2 , deveriam apresentar diferenças significativas, em comparação com os sub-grupos C_1 ou C_2 ; entretanto, devido à diarreia que afetou intensamente este grupo, não ocorreu diferença significativa nesta idade. A primeira diferença significativa, observada nesta pesquisa, ocorreu aos 56 dias, entre A_1 e C_1 e foi aumentando até o final, o que está de acordo com SHUMAN & EARL (1956), apesar de, no caso presente, tratar-se de animais desafiados e o sub-grupo A ter recebido vacinação específica. As médias de pesos, aos 56, 150 e 180 dias, nos grupos desafiados, são semelhantes às de EARL et alii (1962), GOODNOW (1977) e GOODNOW et alii (1979), em suínos afetados por RAI e não vacinados. As médias de peso do sub-grupo A_2 são semelhantes às dos grupos sadios, encontrados por SHUMAN & EARL (1956), EARL et alii (1962), GOODNOW (1977) e GOODNOW et alii (1979). Aos 180 dias, não ocorreu diferença significativa entre os animais dos sub-grupos desafiados A_1 e B_1 . Aos 56, 150 e 180 dias, observou-se uma tendência crescente para as diferenças significativas entre os sub-grupos vacinados e os não vacinados.

6. CONCLUSÕES

1) A técnica usada para o preparo da vacina foi satisfatória quanto ao título e fase de crescimento das bactérias.

2) Não se registrou qualquer manifestação que pudesse ser atribuída à vacina nos camundongos, porcas e leitões vacinados.

3) A vacina induziu boa proteção em camundongos.

4) A vacinação da porca aos 60 e 100 dias de gestação induziu nela bom nível de anticorpos e consequentemente nos leitões, através do colostro.

5) A transmissão de imunidade foi boa, entretanto, no esquema utilizado de vacinar os leitões aos 7 dias, ocorreu interferência da vacina com o título aglutinante passivo.

6) Nos sub-grupos, o título médio de anticorpos foi estatisticamente significativo, entre os grupos vacinados e os controles.

7) A vacina não protegeu contra o desafio, mas aumentou a descontaminação nasal e diminuiu os sinais clínicos.

8) Leitões vacinados, filhos de porcas vacinadas, resistiram ao desafio natural, até a quarta semana de vida.

9) A diferença do peso médio nos sub-grupos vacinados não desafiados e desafiados foi estatisticamente significativa, em relação aos não vacinados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, F.J. Manual de técnica bacteriológica. 2. ed., Zaragoza. Editorial Acribia. 1970. 510p.
2. BERCOVICH, Z. & OOSTERWOUD, R.A. Vaccination with *Bordetella bronchiseptica*. Vaccine on a farm with atrophic rhinitis: an evaluation of a field experiment. Tijdschr. Diergeneesk., Utrecht, 102(8):485-94, 1977.
3. BRANDENBURG, A.C. *Bordetella* rhinitis in pigs: serum and nasal antibody response to *Bordetella* bacterins. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 42(1):23-8, 1978.
4. CROSS, R.F. & CLAFLIN, R.M. *Bordetella bronchiseptica* induced porcine atrophic rhinitis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 141(12):1467-8, 1962.
5. DUNCAN, J.R.; ROSS, R.F.; SWITZER, W.P.; RAMSEY, F.K. Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: Athrophic rhinitis. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 27(117):457-66, 1966.
6. EARL, F.L.; WHITMORE, G.F.; DAMON, R.A.; HETZER, H.O.; TRIBBLE, H.R. Effect of atrophic rhinitis on rate of gain in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 140(5):443-7, 1962.

7. ELDERING, G. A study of the antigenic properties of *Hemophilus pertussis* and related organisms. I. An antigenic fraction obtained from *Brucella bronchiseptica*. Am. J. Hyg., Baltimore, 34(1):1-7, 1941.
8. FARRINGTON, D.O. & SWITZER, W.P. A practical approach to the control of *Bordetella bronchiseptica* rhinitis in United States swine herds. In: INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.6.
9. FETTER, A.W.; SWITZER, W.P.; CAPEN, C.C. Electron microscopic evaluation of bone cells in pigs with experimentally induced *Bordetella* rhinitis (turbinate osteoporosis). Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 36(1):15-22, 1975.
10. FRANQUE. Was ist die Schnüffelkrankheit der schweine? Deut. Z. Tierheilk., 1:75, 1830 apud SWITZER, W.P. & FARRINGTON, D.O. Infectious atrophic rhinitis. In: DUNNE, H.N. & LEMAN, A.D. Diseases of swine. 4. ed., Ames, Iowa State University Press, 1975. p.687
11. GOODNOW, R.A. Control of atrophic rhinitis with a *Bordetella bronchiseptica* bacterin. Vet. Med. Small Anim. Clin., Bonner Spring, 72(7):1210-12, 1977.
12. GOODNOW, R.A.; LEHR, C.D.; McLENNAN, J. Effect of immunization with a *Bordetella bronchiseptica* bacterin on weight gain in weaning pigs. Vet. Med. Small Anim. Clin., Bonner Springs, 73(9):1187-8, 1978.
13. GOODNOW, R.A.; LEHR, C.D.; SHADE, F.J.; WISECARVER, J.L. Mouse potency assay for *Bordetella bronchiseptica* bacterins. J. Clin. Microbiol., Washington, 6(4) : 357-9, 1977.
14. GOODNOW, R.A.; SHADE, F.J.; SWITZER, W.P. Efficacy of *Bordetella bronchiseptica* bacterin in controlling

- enzootic atrophic rhinitis in swine. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 40(1):58-60, 1979.
15. GUERREIRO, M.G.; TREIN, E.; WARTH, W.; ANTINOLFI, T. Rinite atrófica, em suínos, no Rio Grande do Sul. DIPAN, Porto Alegre, 15(130):20-3, 1962.
 16. HÁMORI, D. Studies on the atrophic rhinitis of swine. Acta Vet. Acad. Sci. Hung., Budapest, 20(3):263-71, 1970
 17. HARRIS, D.L.; ROSS, R.F.; SWITZER, W.P. Incidence of certain microorganisms in nasal cavities of swine in Iowa. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 30(9):1621-4, 1969.
 18. HARRIS, D.L. & SWITZER, W.P. Immunization of pigs against *Bordetella bronchiseptica* infection by parenteral vaccination. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 33(10):1975-84, 1972.
 19. HARRIS, D.L. & SWITZER, W.P. Nasal and tracheal resistance of swine against reinfection by *Bordetella bronchiseptica*. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 30(7):1161-6, 1969.
 20. HARRIS, D.L. & SWITZER, W.P. Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and combined inoculum. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 29(4):777-85, 1968.
 21. JENKINS, E.M. An agglutination test for the detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 42(3):286-92, 1978.
 22. JONG, M.F.; BERCHOVICH, Z.; AKKERMANS, J.P.W.M. Atrophic rhinitis control in the Netherlands. In: INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings, Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.5.
 23. KANG, B.K.; KOSHIMIZU, K.; OGATA, M. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. II. Agglutination test on *Bordetella bronchiseptica* infection. Jnp. J. Vet. Sci., Tokyo, 32(6):295-306, 1970.
 24. KANG, B.K.; KOSHIMIZU, K.; OGATA, M. Studies on the

- etiology of infectious atrophic rhinitis swine. III. Field survey by agglutination test in relation to incidence of *B. bronchiseptica* and turbinate atrophy. Jpn. J. Vet. Sci., Tokyo, 35(1):17-23, 1971.
25. KEMENY, L.J. & ANTOWER, W.C. *Bordetella* agglutinating antibody in swine. A herd survey. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 37(4):409-12, 1973.
26. KOSHIMIZU, K.; KODAMA, Y.; OGATA, M. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. V. Experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in conventional piglets. Jpn. J. Vet. Sci., Tokyo, 35(3):223-9, 1973a.
27. KOSHIMIZU, K.; KODAMA, Y.; OGATA, M. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. VI. Effect of vaccination against nasal establishment of *Bordetella bronchiseptica*. Jpn. J. Vet. Sci., Tokyo, 35(5):411-18, 1973b.
28. LONGAREVIC, A.; SPASOJEVIC-RABRENOVIC, V.; BJELOTOMIC, B. Reaction and antibody titre in sera of piglets after injection of *Bordetella bronchiseptica* vaccine. Acta Vet., Belgrade, 29(1-2):71-7, 1979.
29. MUIRHEAD, M.R. Constraint on productivity and their economic effect: Veterinary implications and cost of control. p.45-51, 1979 apud GOODNOW, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev., Washington, 44(4):722-38, 1980. p.732.
30. NAKAGAWA, M.; SHIMIZU, T.; MOTOY, Y. Pathology of experimental atrophic rhinitis in swine infected with *Alcaligenes bronchiseptica* or *Pasteurella multocida*. Nat. Inst. Anim. Health Q., Tokyo, 14(2):61-71, 1974.
31. NAKASE, Y.; KIMURA, M.; SHIMODA, K. Efficacy of an inactivated *Bordetella bronchiseptica* vaccine for atrophic rhinitis under field condition. In: INTERNATIONAL

- CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.8.
32. NIELSEN, N.C.; RIISING, H.J.; BILLE, N. Experimental reproduction of atrophic rhinitis in pigs reared to slaughter weight. In: INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.1.
33. OGATA, M.; KODAMA, Y.; KOSHIMIZU, K. Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. IV. Agglutination test with formalized antigen for *Bordetella bronchiseptica* infection in pigs. Jnp. J. Vet. Sci., Tokyo, 35(2):149-55, 1973.
34. PEDERSEN, K.B. & BARFOD, K. Effect of vaccination of sows with *Bordetella bronchiseptica* on the incidence of atrophic rhinitis in swine. Nord. Veterinaermed., Copenhagen, 29(9):369-75, 1977.
35. PIFFER, I.A.; ÁVILA, L.A.F.; BRITO, J.R.F. Rinite Atrófica dos suínos: isolamento e identificação de *B. bronchiseptica*. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 30(3):285-90, 1978.
36. POWELL, T.W. *Bordetella* rhinitis control utilizing nasal swabs as a tool. In: INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.4.
37. ROSS, R.F.; DUNCAN, J.R.; SWITZER, W.P. Turbinate atrophy in swine produced by pure cultures of *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Med., Bonner Springs, 58(7) : 566-70, 1963b.
38. ROSS, R.F.; SWITZER, W.P.; MARE, C.J. Incidence of certain microorganisms in Iowa swine. Vet. Med., Bonner Springs, 58(7):562-5, 1963a.
39. SHIMIZU, T.; NAKAGAWA, M.; SHIBATA, S.; SUZUKI, K.

- Atrophic rhinitis produced by intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in hysterectomy produced colostrum - deprived pigs. Cornell Vet., Ithaca, 61 (4):696-705, 1971.
40. SHUMAN, R.D. & EARL, F.L. Atrophic rhinitis. VII. A study of the economic effect in a swine herd. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 129(5):220-4, 1956.
 41. SMITH, I.M. & BASKERVILLE, A.J. A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. Res. Vet. Sci., London, 27(2):187-92, 1979.
 42. SNEDECOR, G.W. & COHRAN, W.G. Statistical methods . 6.ed., Ames, Iowa State University Press, 1967.
 43. SWITZER, W.P. & FARRINGTON, D.O. Infectious atrophic rhinitis. In: DUNNE, H.N. & LEMAN, A.D. Diseases of swine. 4. ed., Ames, Iowa State University Press, 1975. p.687-711.
 44. SWITZER, W.P. & FARRINGTON, D.O. Progress in the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 161(11):1325-31, 1972.
 45. YOKOMIZO, Y. & SHIMIZU, T. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res. Vet. Sci., London, 27(1):15-21, 1979.