

Eliana Silva Paladino

**Aspectos anatomopatológicos de pneumonias em suínos de terminação  
causadas pela *Pasteurella multocida* de alta patogenicidade**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Ciência Animal.  
Área: Patologia Veterinária  
Orientador: Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2012







## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho a meu pai.  
Sem ele, nada teria sentido.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente a meu pai, por todo apoio. Sem o incentivo que me deu a cada dia de minha vida, a cada escolha, nada teria se concretizado. Agradeço a inspiração de vida. Assim como agradeço minha avó, D. Maria, por todo o carinho, e por cada velinha acesa para me iluminar.

Agradeço minhas queridas companheiras, Juliana Saes e Michelle Gabardo. É importante ter por perto pessoas como vocês, com experiências diferentes para dividirmos, mas acima de tudo, pessoas de bom humor que tornam cada dia de trabalho mais leve.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, Priscilla, Matheus e Bruno, pelo apoio constante em cada etapa, em especial naqueles de correria, quando estavam sempre prontos a me acudir. E também à Amanda e Carlos, que nem haviam entrado no mestrado e me ajudaram muito na execução de certas etapas do trabalho. E novamente à Michelle pelo apoio diário e ajuda direta em um ano de trabalho, que com certeza foram essenciais e inspiradores.

Agradeço a cada amiga minha, Carla, Marina, Ana Cristina, Letícia, Camila, Karin, Stella, e especialmente ao meu lindo amigo Felipe, por todo o apoio e companheirismo de tantos anos de amizade. Mesmo de longe, cada lembrança foi suficiente para me dar estímulo a cada dia.

Agradecimentos mais que especiais ao Dr. Nelson Morés, pelo apoio na execução de algumas etapas deste trabalho assim como por todos os ensinamentos na época do estágio. E ao João Xavier, pela execução destas etapas, mas principalmente pelo companheirismo na época de estágio na EMBRAPA, e até hoje.

Agradeço imensamente ao Professor Roberto Guedes pela oportunidade, pela paciência, pelos ensinamentos e pelo exemplo de ética e profissionalismo.

E por último, mas com a mesma importância, agradeço a cada empecilho que estive em meu caminho. Cada dificuldade que passei, deu mais valor ao meu trabalho final, e mais orgulho de ter conseguido superá-los e chegar a esta etapa. Às vezes, falta de sorte no trabalho, às vezes problemas pessoais, mas todos contribuíram igualmente para que eu me tornasse um ser humano mais forte e mais digno.

*“Ando devagar  
Porque já tive pressa  
E levo esse sorriso  
Porque já chorei demais.  
Hoje me sinto mais forte,  
Mais feliz, quem sabe.  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei,  
Ou nada sei”*

*(Almir Sater)*

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>09</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>09</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 <i>Pasteurella multocida</i> .....	15
2.1.1 Fatores de Virulência e Patogênese .....	16
2.1.2 Sinais Clínicos .....	17
2.1.3 Lesões .....	17
2.2 Co-infecções .....	18
2.3 Antimicrobianos .....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Local de realização do experimento .....	21
3.2 Amostragem .....	21
3.3 Coleta e remessa de material .....	22
3.4 Processamento das amostras .....	22
3.4.1 Cultivo e isolamento bacteriológico .....	23
3.4.2 Identificação dos isolados .....	24
3.4.3 Sensibilidade antimicrobiana .....	24
3.4.4 Processamento histológico .....	24
3.4.5 Imuno-histoquímica .....	25
3.5 Análise Estatística .....	25
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 Amostragem .....	25
4.2 Isolamento bacteriológico .....	26
4.2.1 Identificação dos isolados .....	26
4.2.2 Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos .....	28
4.3 Alterações Anatomopatológicas .....	30
4.3.1 Macroscopia .....	30
4.3.1.1 Pulmões .....	30
4.3.1.2 Outros órgãos .....	31
4.3.2 Histopatologia .....	33
4.4 Imuno-histoquímica .....	36
4.5 <i>Pasteurella multocida</i> de alta patogenicidade .....	38
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>51</b>

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Listagem de rebanhos amostrados nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso, subdivididos pela origem das amostras. ....	22
<b>Tabela 2:</b> Alterações macroscópicas em amostras clínicas e de frigorífico. ....	31
<b>Tabela 3:</b> Alterações histopatológicas em amostras clínicas e de frigorífico. ....	35
<b>Tabela 4:</b> Perfil de positividade para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , Influenza tipo A e Circovirus suíno tipo 2, detectadas pela imuno-histoquímica, nas 44 amostras de pulmão com isolamento prévio de <i>Pasteurella multocida</i> , provenientes de 28 rebanhos. ....	36
<b>Tabela 5:</b> Lesões histopatológicas relacionadas à infecções mistas de <i>Pasteurella multocida</i> e <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , ou <i>P. multocida</i> e Influenza tipo A, os três agentes ou somente <i>P. multocida</i> , em amostras clínicas e de abate. ....	37
<b>Tabela 6:</b> Caracterização de amostras clínicas e coletadas em frigorífico, com diagnóstico de somente <i>Pasteurella multocida</i> . ....	38
<b>Tabela 7:</b> Alterações macroscópicas de amostras com diagnóstico de somente de <i>Pasteurella multocida</i> , e demais amostras com infecções concomitantes. ....	38

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática de avaliação macroscópica de pulmões, onde cada lobo pulmonar recebe uma pontuação de área acometida em relação a pontuação de área total, totalizando 100 pontos, segundo Halbur et al. (1995). (D – lado direito; E – lado esquerdo)...	23
<b>Figura 2:</b> Mapa de localização dos municípios dos rebanhos incluídos no experimento, em cada mesorregião do estado de Minas Gerais. Foram avaliadas amostras de 28 rebanhos, entretanto, em cinco rebanhos não foi possível a obtenção do município de origem. ....	26
<b>Figura 3:</b> A: <i>Pasteurella multocida</i> tipo A: colônias médias, acinzentadas, de aspecto mucóide, não hemolíticas (Ágar sangue - ASA). B: Teste da hialuronidase: placa de ASA com colônias de <i>P. multocida</i> tipo A e estria de <i>Staphylococcus aureus</i> (*). Nota-se morfologia de colônias de <i>P. multocida</i> de menor tamanho, quando localizadas próximo à estria (seta). C e D: Sensibilidade a antimicrobianos (teste de disco difusão em Ágar Müller-Hinton): enrofloxacina (ENO), ceftiofur (CTF), tiamulina (TIAMU), espectinomicina (EPT), lincomicina (LIN), ciprofloxacina (CIP), amoxicilina (AMO), penicilina (PEN), norfloxacina (NOR). Nota-se ao redor de cada disco, halo de ausência de crescimento bacteriano (seta longa), exceto para lincomicina (seta curta), onde houve crescimento bacteriano ao redor de todo o disco, indicando resistência ao princípio ativo. ....	27
<b>Figura 4:</b> Perfil de sensibilidade das 15 drogas avaliadas frente aos 44 isolados de <i>Pasteurella multocida</i> obtidos de pulmões. ....	28

**Figura 5:** Porcentagem de isolados sensíveis a cada um dos 15 antimicrobianos testados, comparativamente entre amostras clínicas (n=25) e de frigorífico (n=19). \* diferença estatística significativa entre amostras clínicas e de frigorífico, para  $p < 0,05$ . ..... 29

**Figura 6:** Comparação do perfil de sensibilidade de isolados de *Pasteurella multocida* obtidos de pulmão e extrapulmonar, em quatro amostras, frente a 15 antimicrobianos. \* diferença estatística significativa, para  $p < 0,05$ , entre isolado de pulmão e extrapulmonar, respectivamente em cada caso. .... 29

**Figura 7:** **A:** Pneumonia crânio ventral – vista dorsal. Áreas de consolidação em lobos apicais. **B:** Pneumonia cranioventral – vista ventral. Áreas de consolidação em lobos apicais e ventral **C:** Pleurite fibrinosa em lobos apicais direito, associado à hemorragia em região dorsal do lobo diafragmático direito (amostra E03.6). **D:** Pericardite fibrinosa, com acúmulo de quantidade moderada de exsudato avermelhado com grumos de fibrina (seta) (amostra E03.6). **E:** Pulmão: Pleurite e pericardite fibrinosas grave, com aderências de folhetos pericárdicos (amostra E10.3). **F:** Pericardite fibrinopurulenta subaguda grave, com áreas de aderências entre saco pericárdico e epicárdio (amostra E10.3). **G:** Pulmão: Área de consolidação cranioventral, com abscesso em lobo médio esquerdo (detalhe) (amostra E01.2). **H:** Linfonodo mediastínico: Linfadenomegalia acentuada (seta). ..... 32

**Figura 8:** **A:** Broncopneumonia: Intensa infiltração inflamatória em espaço alveolar e ao redor de brônquios e bronquíolos. Lúmen das vias aéreas repleto de células inflamatórias e restos celulares (seta). Intensa congestão. HE, 40X. **B:** Bronquiectasia: extensa área de necrose de bronquíolo, com restos celulares e grumos bacterianos no centro, e infiltração celular ao redor da área de necrose (amostra E01.1). HE, 40X. **C:** Pulmão: Infiltração neutrofílica, edema e fibrina (seta) em espaço alveolar. Intensa congestão. HE, 200X. **D:** Pulmão e pleura: Pleurite fibrinosa aguda. Intensa exsudação de fibrina e presença de edema em espaço interlobular (IL), espaço subpleural e pleura (P). Intensa congestão. HE, 200X. **E:** Pleurite crônica (E11.1). Acentuado espessamento de pleura (P), com intensa proliferação de fibroblastos. HE, 40X. **F:** Linfonodo mediastínico: Linfadenite neutrofílica fibrino-hemorrágica aguda grave. Intensa infiltração neutrofílica, associada à intensa exsudação de fibrina e hemorragia multifocal (amostra E18.2). HE, 200X. .... 34

---

## LISTA DE ANEXOS

---

**Anexo I:** Modelo para caracterização de alterações histopatológicas. .... 51

**Anexo II:** Protocolo de imuno-histoquímica de Influenza tipo A e Circovirus suíno tipo 2. .... 52

---

## RESUMO

As doenças respiratórias dos suínos são responsáveis por inúmeras perdas diretas e indiretas para a suinocultura. Dentro do Complexo de Doenças Respiratórias de Suínos (PRDC), *Pasteurella multocida* é uma bactéria frequentemente envolvida nestes quadros em animais de terminação. Historicamente, a *P. multocida* é conhecida como um agente oportunista, causador de pneumonias em leitões que apresentaram infecção prévia por outros agentes bacterianos ou virais. Atualmente, cita-se em diversas partes do mundo a capacidade desta bactéria de causar infecção primária, e levar os animais à morte. Com isso, o objetivo deste estudo foi fazer uma avaliação anatomopatológica e microbiológica de amostras de pulmão obtidas de animais com doença respiratória clínica e compará-las como amostras obtidas de frigorífico. Avaliou-se 25 amostras, obtidas de 14 rebanhos com quadro clínico respiratório relevante na terminação, e 19 amostras, coletadas ao abate, oriundas de outros 14 rebanhos, totalizando 44 pulmões avaliados. De todas estas amostras fizeram-se cultivos bacterianos, e incluídos no experimento somente os casos com isolamento puro de *P. multocida*. Estes isolados foram testados quanto à sensibilidade a 15 antimicrobianos, e todas as amostras de pulmão foram examinadas macro e microscopicamente. Ainda, pesquisou-se co-infecções com Influenza tipo A, Circovirus suíno tipo 2 (PCV2) e *Mycoplasma hyopneumoniae*, através de imuno-histoquímica (IHQ). A avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos demonstrou maior taxa de sensibilidade ao ceftiofur e espectinomicina, e maior taxa de resistência à lincomicina e penicilina. Isolados de *P. multocida* provenientes de pulmões coletados ao abate demonstraram ser mais frequentemente sensíveis a amoxicilina que cepas isoladas de amostras clínicas ( $p < 0,05$ ). Houve maior ocorrência de pleurite em amostras clínicas ( $p < 0,05$ ), e uma tendência numérica que indicou maior frequência de pericardite, linfadenomegalia e presença de líquidos cavitários também em amostras clínicas. Pela IHQ, oito amostras foram positivas para Influenza tipo A, 11 para *M. hyopneumoniae*, 12 apresentaram infecção mista de *M. hyopneumoniae* e Influenza tipo A, e nenhuma foi positiva para PCV2. Treze amostras foram negativas à IHQ para os três agentes testados, e apresentaram somente isolamento de *P. multocida*. Dentre estas 13 amostras, foi possível observar a ocorrência de pleurite, pericardite e linfadenomegalia, em amostras clínicas, fato que não ocorreu em amostras de frigorífico. Sugere-se, portanto, a sua capacidade de causar quadros respiratórios primariamente. No entanto, não foi possível pesquisar neste estudo, marcadores de virulência que justifiquem este quadro.

**Palavras-chave:** pneumonia, *P. multocida*, suínos, terminação

## ABSTRACT

Swine respiratory diseases are responsible for several direct and indirect losses to swine herds. *Pasteurella multocida* is a frequent bacterium involved in the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) in finishing pigs. Historically, *P. multocida* is known as an opportunist agent, causing secondary bacterial pneumonia in pigs after previous *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or viral infections. Nowadays, several studies have been shown the possible ability of this bacterium to cause primary infection, leading to death. The aim of this study was to evaluate the anatomopathology and microbiology of pulmonary lesions of samples obtained from animals with clinical respiratory disease and compare to pulmonary samples obtained at slaughter. Twenty-five lung samples, from 14 herds with clinical respiratory disease, and 19, collected at slaughter, from other 14 herds, in a total of 44 evaluated lung samples were studied. In all lung samples, bacterial isolation was performed, and only samples with pure *P. multocida* growth were included in the evaluation. *P. multocida* isolates were tested for antimicrobial sensitivity to 15 drugs, and lung samples were submitted to gross and microscopic evaluation. Also, co-infections with Influenza type A, porcine Circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* were studied using immunohistochemistry (IHC). The antimicrobial sensitivity evaluation showed higher sensitivity rate to ceftiofur and spectinomycin, and some resistance rate to lincomycin and penicillin. *P. multocida* isolated from lungs collected at slaughter were more sensitive to amoxicillin than isolated from clinical samples ( $p < 0.05$ ). Pleuritis was more often observed in lungs of clinical samples than lungs obtained at slaughter ( $p < 0.05$ ). Moreover, there was a numerical trend that indicated that pericarditis, lymphadenomegaly and cavity exudates occurred more often in clinical samples. By IHC, eight samples were positive to Influenza type A, 11 to *M. hyopneumoniae*, 12 had *M. hyopneumoniae* and Influenza type A mixed infection, none were positive to PCV2, and 13 were negative to all three of these agents and only tested positive to *P. multocida*. In these samples, lesions such as pleuritis, pericarditis and lymphadenomegaly were observed only in clinical samples. This finding suggests the ability of these *P. multocida* isolates to cause primary infection however, it was not possible to determine in this study specific virulence markers.

**Key-words:** pneumonia, *P. multocida*, finishing, pigs

## 1. INTRODUÇÃO

A intensificação da indústria suinícola otimizou a produção de carne suína, porém paralelamente provocou o aumento de doenças infecciosas em consequência ao confinamento e aumento de densidade animal, mistura de lotes de diferentes origens e diversos outros desafios. As desordens respiratórias constituem um dos problemas mais importantes na suinocultura moderna devido a perdas econômicas decorrentes de mortalidade, refugagem e condenação de carcaças. O complexo de doenças respiratórias dos suínos (PRDC – *Porcine Respiratory Disease Complex*) é uma síndrome bem reconhecida que ocorre em todo o mundo, destacando a pneumonia enzoótica suína, causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* e outras bactérias secundárias, e pneumonias virais, causadas por agentes tais como o Circovirus suíno tipo 2 (*Porcine Circovirus type 2* - PCV2), vírus da Influenza suína e vírus da PRRS (*Porcine Respiratory Reproductive Syndrome* – Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína). O PRDC acomete animais em fase de crescimento e terminação, e a infecção primária por estes agentes compromete a saúde pulmonar dos animais, levando a infecções bacterianas secundárias importantes, que terminam por agravar o quadro (Kim et al., 2003; Pijoan, 2006, Sobestiansky et al., 2007; Honnold, 2009; Wellenberg et al., 2010).

O PRDC é responsável por prejuízos à suinocultura, pois, além de gastos inerentes às despesas com diagnóstico e tratamento dos animais enfermos, leva a diminuição de ganho de peso diário, atraso de crescimento, aumento da conversão alimentar e mortalidade de leitões de considerável valor econômico agregado. Além disso, aumenta taxa de desvio de carcaças em frigoríficos, sendo considerado o problema infeccioso mais observado em plataformas de inspeção (Pijoan, 2006). Estima-se que perdas

econômicas decorrentes de afecções respiratórias no Brasil no período de 2006 a 2008 tenham sido da ordem de R\$ 216 milhões ao ano, de acordo com dados do Serviço de Inspeção Federal (Morés, 2011).

Atualmente, no Brasil, os protagonistas do PRDC são *M. hyopneumoniae*, PCV2 (Castro, 2008; Souza et al., 2008; Costa et al., 2009; Heres, 2009; Kich et al., 2010) e Influenza tipo A, causada pelos subtipos H1N1 e H3N2 (Brentano et al., 2002; Mancini et al., 2006; Schaefer et al., 2011). O vírus da PRRS é exótico no Brasil. A *Pasteurella multocida* aparece como o agente bacteriano secundário mais frequente no PRDC, sendo diretamente relacionada a quadros de pleuropneumonia (Morés, 2006; Hansen et al., 2010; Fablet et al., 2011; Pors et al., 2011), e também à rinite atrófica progressiva (RAP). Outros agentes bacterianos de grande relevância são o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente da pleuropneumonia suína, o *Haemophilus parasuis*, da Doença de Glasser, *Streptococcus suis* e *Actinobacillus suis* (Kim et al., 2003; Pijoan, 2006; Bethe et al., 2009; Hansen et al., 2010; Wellenberg et al., 2010).

A *P. multocida* é observada em granjas produtoras de suínos em todo o mundo, até mesmo naquelas de elevado *status* sanitário (Kich et al., 2010). Historicamente, esta bactéria é considerada fator agravante das infecções pulmonares por *M. hyopneumoniae* e PCV2 (Kim et al., 2003; Pijoan, 2006; Honnold, 2009; Hansen et al., 2010; Wellenberg et al., 2010; Fablet et al., 2011). Entretanto, pesquisadores no sul do Brasil (Borowski, 2001; Morés, 2006; Borowski et al., 2007; Kich et al., 2007, 2010) e na Argentina (Cappuccio et al., 2004) têm sugerido a sua participação como agente primário, capaz de induzir quadro de extrema gravidade, similar aos observados na pleuropneumonia causada pelo *A. pleuropneumoniae* e pleurite e pericardite

fibrinosas causadas pelo *H. parasuis*, e, conseqüentemente, causando mortalidade em animais de crescimento e terminação. Médicos veterinários especializados em suínos também relatam a observação da mudança do perfil patológico do quadro de pasteurelose em suínos de terminação. Esses relatos podem indicar que cepas de *P. multocida* de alta virulência, capazes de causar lesões pneumônicas típicas de *A. pleuropneumoniae* e/ou *H. parasuis* estejam circulando nos rebanhos suínos brasileiros, em especial nas regiões de produção mais expressiva como Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso.

Até o presente momento não foi realizada no Brasil uma caracterização anatomopatológica e de sensibilidade antimicrobiana destas cepas de elevada patogenicidade, bem como sua possível associação com outros agentes infecciosos pulmonares. Este estudo visou avaliar a ocorrência deste agente em granjas com o quadro de pleuropneumonia fibrinosa ou hemorrágica e mortalidade de leitões em fase de terminação. Além disto, fez-se a caracterização do quadro anatomo-histopatológico de amostras oriundas destes rebanhos, determinou-se a ocorrência de co-infecções, e avaliou-se a susceptibilidade das amostras de *P. multocida* a antimicrobianos comumente utilizados na suinocultura brasileira. Realizou-se ainda a comparação destas avaliações acima citadas entre amostras de pulmão obtidas em granjas com histórico de problema respiratório clínico grave, associado a aumento de mortalidade na terminação, e casos broncopneumônicos graves obtidos de suínos ao abate em frigoríficos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os desafios sanitários a que a suinocultura é exposta interferem na viabilidade econômica do setor, visto que mortalidade, atraso no

crescimento dos animais e condenação de carcaças impactam o sucesso econômico da atividade. As doenças respiratórias estão diretamente envolvidas nestes prejuízos, sendo responsáveis, por exemplo, por uma parte significativa da condenação de carcaças ao abate. Em 1987, estudo no estado de Santa Catarina relatou prevalência de 55,3% de pneumonia observada ao abate, e ainda estimou uma perda de 2,4 suínos para cada 100 animais abatidos (considerando peso agregado de 95kg), em rebanhos com lesões pulmonares (Sobestiansky et al., 1987). Na década seguinte, outro estudo na mesma região demonstrou prevalência de 42,6% de lesões respiratórias ao abate (Sobestiansky et al., 1999). Em 2001, os mesmos autores relatam prevalência de 54,9% de lesões pulmonares avaliadas ao abate, na região sul do Brasil (Sobestiansky et al., 2001). Ao longo dos anos, apesar dos esforços para modernização do setor, este desafio continua presente. Um trabalho mais amplo e atual confirma esta condição ao demonstrar que no período de 2002 a 2006 a prevalência média de pneumonia observada ao abate foi de 63,3%±7,68, em uma avaliação que abrangia dez estados brasileiros (Silva et al., 2006).

Historicamente, a *Pasteurella multocida* é considerada como o agente secundário mais envolvido nas co-infecções das doenças respiratórias (Kim et al., 2003; Pijoan, 2006; Bethe et al., 2009; Hansen et al., 2010; Kich et al., 2010; Fablet et al., 2011), e sua participação nestes quadros é relatada em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (Morés, 2006; Kich et al., 2010). Kim et al. (2003), Hansen et al. (2010), Fablet et al. (2011), e Pors et al. (2011) relatam a presença expressiva da *P. multocida* no PRDC na Coréia, França e Dinamarca, respectivamente. Morés (2006) relata o envolvimento deste agente em 51,3% dos casos de desvio de carcaças por pneumonia, em estudo realizado em Santa Catarina. Trabalhos realizados por laboratórios de

diagnóstico (Costa et al., 2009; Kich et al., 2010) revelam presença marcante da *P. multocida* em casos de pneumonia enzoótica em Santa Catarina e Minas Gerais, respectivamente. Barbosa et al. (2009) demonstram ser a *P. multocida* o agente mais frequentemente encontrado em casos relacionados ao PCV2. Ainda, Silva et al. (2009) relatam surto de pneumonia, com mortalidade de leitões de terminação no Mato Grosso, também com envolvimento da mesma bactéria.

A *P. multocida* é um agente que faz parte da microbiota do trato respiratório de suínos (Pijoan, 2006; Boyce et al., 2010) e, por muito tempo foi considerada um agente oportunista, causador de infecção secundária em quadros de pneumonia instalados por outros agentes, como o PCV2 e *M. hyopneumoniae* (Pijoan, 2006; Hansen et al., 2010). Porém, existem relatos que indicam a capacidade deste agente de causar lesões primárias (Morés, 2006; Kich et al., 2007; 2010). Kich et al. (2007) demonstraram experimentalmente a capacidade de cepas de *P. multocida* tipo A, isoladas de um surto ocorrido em uma granja comercial em Santa Catarina, de desenvolver pneumonia como agente primário. Ao inocularem cepas de campo em animais livres de patógenos específicos (SPF – *Specific Pathogen Free*), reproduziram um quadro muito severo de pleuropneumonia, com características anatomopatológicas semelhantes às aquelas causadas pelo *A. pleuropneumoniae*, com pleuropneumonia necro-hemorrágica e fibrinosa, denominadas pelos autores como “*App-like lesions*” (lesões semelhantes à *App* - *A. pleuropneumoniae*) (Kich et al., 2007; 2010). Da mesma forma, Cappuccio et al. (2004), na Argentina, descreveram lesões similares em animais de campo, nos quais foi isolada somente *P. multocida*. Entretanto, não existem relatos semelhantes na literatura em outros países ou regiões do Brasil, embora existam indicações da presença do mesmo quadro em rebanhos

brasileiros (Borowski, 2001; Kich et al., 2007; Heres, 2009; Kich et al., 2010).

## 2.1 *Pasteurella multocida*

A *P. multocida* é uma bactéria membro da família Pasteurellaceae e gênero *Pasteurella*. Apresenta três subespécies: *gallicida*, *septica* e *multocida*, sendo que a última está diretamente relacionada a doenças em animais domésticos, inclusive suínos. É um cocobacilo pequeno, gram negativo, extracelular, que não apresenta motilidade e nem capacidade de esporulação. O cultivo se dá em meios enriquecidos com soro ou sangue, e não necessita de fatores X ou V para crescimento. Não produz hemólise, não cresce em meio MacConkey, e é anaeróbia facultativa, crescendo plenamente em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. As características bioquímicas demonstram catalase, citocromo oxidase e indol positivas e urease negativa (Quinn et al., 1994; Songer e Post, 2005). Alguns autores sugerem a classificação de amostras de *P. multocida*, com base em características bioquímicas de produção de ácido a partir de pentoses, como xilose e arabinose, dissacarídeos, como maltose e trealose, e alcoóis polihídricos, como sorbitol, manitol e dulcitol (Borowski et al., 2002). Para a definição da subespécie *multocida*, espera-se a fermentação de sorbitol, porém trealose e xilose são variáveis, e não fermentam arabinose e dulcitol (Quinn et al., 1994; Songer e Post, 2005). A espécie ainda possui capacidade de fermentação de alguns carboidratos, como monose, sacarose e glicose, e não há produção de gás. Não fermenta lactose, apresenta capacidade de transformar nitrito em nitrato e é gelatinase negativo.

A cápsula bacteriana é composta de lipopolissacarídeos (LPS), e baseado em sua composição, subdivide-se a espécie *P. multocida* em cinco sorotipos, A, B, D, E e F, e as doenças estão associadas a tipos capsulares e espécie animal específicos. Os

sorotipos capsulares A, B e D estão ligados à quadros patológicos em suínos. O sorotipo B pode ocasionar doença severa, porém é raro. Os sorotipos A e D estão ligados a quadros de pleuropneumonia e RAP, respectivamente, embora o inverso seja relatado (Quinn et al., 1994; Songer e Post, 2005; Pijoan, 2006; Borowski et al., 2007). Pode-se classificá-la também se baseando em antígenos somáticos capsulares, com números seqüenciais de 1 a 16, onde cada um expressa diferentes moléculas de LPS (Boyce et al., 2010). Os sorotipos somáticos 3 e 5 são os mais frequentemente observados em suínos, sendo A:3, A:5, D:5, e D:3, em ordem de prevalência, os que mais são encontrados em patologias respiratórias nesta espécie (Pijoan, 2006).

A tipificação capsular pode ser realizada por métodos fenotípicos, como os citados por Carter e Rundell (1975) e Carter e Subronto (1973), contudo autores afirmam que a tipificação baseada em métodos genéticos permite melhor discriminação de cepas, e podem diferenciar clones específicos dentro de quadros clínicos (Chen et al., 2002; Lainson et al., 2002; Boyce et al., 2010; García et al., 2011). Um método desenvolvido por Townsend et al. (2001), utiliza cinco pares de *primers* específicos para cada tipo capsular, e através de reação em cadeia da polimerase (PCR - ), determina o tipo capsular de maneira mais confiável que os métodos fenotípicos, que podem apresentar falhas (Boyce et al., 2010).

### **2.1.1 Fatores de Virulência e Patogênese**

A patogênese e mecanismos de virulência da *P. multocida* não são completamente compreendidos. Os fatores de virulência conhecidos são adesinas, fimbrias, hemaglutininas, sideróforos, sialidases, proteases e proteínas de membrana externas, que auxiliam na capacidade de invasão e adesão da bactéria às superfícies epiteliais

do hospedeiro. A produção da toxina dermonecrótica é essencial para a evolução da RAP, porém seu papel nos quadros de pleuropneumonia é discutível. Esta exotoxina é produzida pelo gene *toxA*, em geral relacionado ao sorotipo D, e menos frequentemente encontrado no sorotipo A. Esta toxina pode ser observada em casos de pleuropneumonia, porém sua ocorrência é rara e não fundamental para o desenvolvimento do quadro pulmonar (Songer e Post, 2005; Pijoan, 2006; Borowski et al., 2007; Boyce et al., 2010). Os resultados obtidos em trabalhos de Borowski et al. (2002) e Heres (2009) corroboram esta afirmativa, onde, através da PCR, não foi observada a presença do gene *toxA* nos isolados dos casos de pneumonia avaliados.

A disseminação da *P. multocida* se dá pelo contato direto entre os animais dentro do rebanho, e sua via de entrada é pelo trato respiratório. A bactéria tem fraca capacidade de aderência ao epitélio, porém o sorotipo A adere-se melhor em células ciliadas do trato respiratório; portanto, são mais resistentes ao mecanismo mucociliar de defesa. Cepas do sorotipo D têm melhor adesão em células não ciliadas (Pijoan, 2006; Boyce et al., 2010). A cápsula de LPS é um mecanismo de virulência muito importante. Os polissacarídeos de todos os sorotipos são compostos por glicosaminoglicanos, idênticos à estrutura primária da matriz extracelular de células eucarióticas, que nestas tem papel essencial na adesão das células e na regulação da atividade protéica. Com isso, a capacidade do hospedeiro de reconhecer bactérias que tenham estas moléculas em sua composição fica comprometida, sendo assim um importante mecanismo de evasão da resposta imune inata do hospedeiro. Assim que ocorre invasão e colonização do tecido, ocorre intensa resposta inflamatória, porém, em alguns casos, esta não é suficiente para

impedir a evolução do quadro (Boyce et al., 2010).

O sorotipo D contém heparina na cápsula de LPS, e o sorotipo A contém, na composição de sua cápsula, uma camada de ácido hialurônico, que também auxilia a evasão do microrganismo do sistema de fagocitose do hospedeiro (Pijoan, 2006; Boyce et al., 2010). Porém, não é possível determinar quais os fatores de virulência envolvidos na invasão e colonização pulmonar em quadros de pneumonia quando se comporta como um agente oportunista, e tampouco em casos de maior patogenicidade (Pijoan, 2006; Boyce et al., 2010).

### 2.1.2 Sinais Clínicos

A pasteurelose pulmonar acomete animais em fase de recria e terminação, e estes apresentam anorexia, dificuldade respiratória com respiração abdominal, tosse, prostração, hipertermia, secreção nasal e ocular. Na pele do abdômen, podem aparecer manchas arroxeadas, sugestivas de choque endotóxico. Os sinais observados são indistinguíveis daqueles causados por outros agentes causadores de doenças respiratórias em suínos. O rebanho passa a ter lotes em crescimento com alta variabilidade, e morte pode ocorrer, porém a taxa de mortalidade é proporcional aos desafios de cada rebanho individualmente (Pijoan, 2006; Honnold, 2009; Kich et al., 2010).

### 2.1.3 Lesões

As alterações observadas não são consideradas típicas de *P. multocida*, e sim características de infecção bacteriana secundária nos pulmões. Observam-se áreas de consolidação com distribuição cranioventral, de coloração vermelha a acinzentada, dependendo do curso da infecção, associado a edema intenso, e exsudação mucopurulenta nas vias aéreas (Pijoan, 2006; Caswell e Williams, 2007). Ambos os sorotipos capsulares A e D tem

capacidade de produzir nódulos necróticos e purulentos no pulmão (Morés, 2006; Pijoan, 2006; Kich et al., 2007; 2010). Pleurite pode ser observada, e em fase inicial, apresenta aspecto ressecado e cor brancacenta. Com a progressão do quadro podem ocorrer aderências pleurais. Os linfonodos mediastínicos apresentam aumento de volume e, ao corte, cor avermelhada (Pijoan, 2006; Caswell e Williams, 2007).

Entretanto, Kich et al. (2007) relatam que, após inoculação experimental de cepa de campo em animais SPF, as alterações observadas eram de maior gravidade. Os animais inoculados apresentaram extensas áreas de consolidação pulmonar, intensa exsudação de fibrina na superfície da pleura visceral, presença de líquido avermelhado com filamentos de fibrina livres na cavidade torácica e dentro do saco pericárdico. Observaram ainda severa exsudação de fibrina na superfície do epicárdio com aderência ao saco pericárdico, achado este semelhante ao relatado por Pors et al. (2011), e presença de um nódulo fibrinohemorrágico localizado no lobo diafragmático. Estes animais apresentaram um quadro de pleuropneumonia necrohemorrágica e fibrinosa e poliserosite fibrinosa (Kich et al., 2007), com características bastante semelhantes às doenças causadas por *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis* (Caswell e Williams, 2007). No entanto, houve isolamento puro de *P. multocida* tipo A de todas as regiões onde se observou lesões, especialmente de onde havia presença de fibrina, sugerindo a capacidade deste agente de causar um quadro anatomopatológico diferente do que é citado na literatura (Kich et al., 2007).

Segundo Pijoan (2006) e Caswell e Williams (2007), as lesões histológicas também não são típicas de *P. multocida*, e podem caracterizar infecção por qualquer agente bacteriano, onde se observa broncopneumonia, com infiltração

neutrofílica e histiocitária em lúmen alveolar, bronquial e bronquiolar; e exsudação de fibrina pode ocorrer, porém não é marcante. Os brônquios e bronquíolos em geral não apresentam alterações, porém podem sofrer necrose caso haja infecções concomitantes com outros agentes, como vírus da Influenza e PCV2. Kich et al. (2007) relatam lesões histopatológicas diferentes, encontradas na mesma inoculação experimental, citada anteriormente. Observaram intensa infiltração neutrofílica, hemorragia e necrose de coagulação de parênquima pulmonar; bronquite purulenta intensa com acúmulo de grande quantidade de restos celulares no lúmen bronquial; pleurite neutrofílica grave, e em um dos animais, observou-se fibroplasia em pleura e espaços interlobulares, sugerindo cronicidade do quadro. Observaram ainda, intensa exsudação de fibrina em alvéolos, espaços interlobulares e subpleural, e superfície de pleura; pericardite e peritonite fibrinosas e linfadenite neutrofílica e hemorrágica, novamente contrariando a literatura no que diz respeito ao tipo e gravidade de lesões observadas.

Pijoan (2006) e Caswell e Williams (2007) afirmam que as lesões inerentes à infecção por *P. multocida* estão restritas a cavidade torácica, e também negam a possibilidade de a pleurite nestes casos ser fibrinosa, sugerindo esta ser um tipo de lesão típica de *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis*. No entanto, Kich et al. (2007) contrariaram estas afirmativas ao reproduzir experimentalmente pleurite e peritonite fibrinosas com envolvimento exclusivo de *P. multocida*.

## 2.2 Co-infecções

Atualmente, o PCV2, Influenza tipo A e o *M. hyopneumoniae* aparecem como protagonistas do PRDC em todo o mundo, inclusive no Brasil (Kim et al., 2003; Ciacci-Zanella et al., 2006; Morés, 2006;

Sobestiansky et al., 2007; Castro, 2008; Souza et al., 2008; Costa et al., 2009; Heres, 2009; Kich et al., 2010; Wellenberg et al., 2010). O vírus da PRRS e Coronavírus respiratório são integrantes do PRDC, porém não há relatos de ocorrência no Brasil (Brentano et al., 2002; Morés et al., 2007).

O *M. hyopneumoniae* pode ser transmitido aos leitões ao nascimento, sendo a porca a maior fonte de infecção, porém os primeiros sinais clínicos só aparecerão às seis semanas de vida. Outra fonte de infecção ocorre na fase de recria, quando ocorre mistura de lotes, e animais portadores eliminam o agente e infectam animais livres. O *M. hyopneumoniae* possui capacidade de se aderir ao epitélio ciliado das vias respiratórias, onde coloniza e se multiplica em toda a árvore brônquica. Este fenômeno leva a ciliostase e posterior destruição dos cílios, com redução da eficiência do sistema mucociliar. Ocorre hiperplasia linfocitária peribronquiolar, alteração histológica típica da infecção por este agente. Macroscopicamente, observa-se consolidação pulmonar cranioventral, com acúmulo de secreção muco-purulenta nas vias aéreas (Sobestiansky et al., 2007).

O PCV2 é o agente da circovirose, uma síndrome multifatorial que leva ao definhamento dos animais. Dentro desta síndrome, uma das manifestações clínicas que pode ocorrer é doença respiratória em suínos entre cinco e 12 semanas de idade. Quando ocorre, as lesões observadas são de pneumonia intersticial, onde macroscopicamente o pulmão encontra-se não colapsado. Histologicamente, as paredes alveolares estão espessadas por infiltração linfocitária, assim como infiltração peribronquiolar e perivascular, e o vírus fica alojado no citoplasma destas células inflamatórias. Em órgãos linfoides, há marcante depleção linfóide associada à intensa infiltração histiocitária e inflamação granulomatosa, com formação de células

gigantes multinucleadas (Kim et al., 2003; Caswell e Williams, 2007; Morés et al., 2007; Wellenberg et al., 2010).

O vírus da Influenza tipo A também faz parte do PRDC, e existem relatos de circulação dos subtipos H1N1 e H3N2 nos rebanhos brasileiros (Brentano et al., 2002; Mancini et al., 2006; Schaefer et al., 2011). É uma doença transmitida pelo contato direto de animais com secreções de outros animais contaminados ou por aerossóis, e a colonização é restrita ao trato respiratório. Macroscopicamente, as lesões observadas são de consolidação pulmonar cranioventral, com distribuição lobular. Na histologia, as alterações mais marcantes ocorrem no epitélio de brônquios e bronquíolos, pois é onde ocorre infecção viral, que leva a lise destas células epiteliais. Nestes casos, é comum observar a princípio um adelgaçamento do epitélio, seguido de hiperplasia em um segundo estágio, na tentativa de reparo. Com o avanço do quadro, leva a necrose do epitélio, com acúmulo de restos celulares e células inflamatórias no lúmen das vias aéreas. Ainda, ocorre infiltração de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos ao redor de vasos e bronquíolos e no interstício pulmonar (Caswell e Williams, 2007).

As afecções acima citadas, além de causar uma doença respiratória primária, interferem no sistema de defesa pulmonar, o que permite a infecção por agentes bacterianos secundários. O diagnóstico é imprescindível para determinar os procedimentos a serem instaurados, e para tal, o histórico clínico, caracterização anatomopatológica, testes sorológicos, exames bacteriológicos, histopatológicos e imuno-histoquímica são de grande valia na tomada de decisão. Ressalta-se a importância de determinar ao certo quais os agentes envolvidos em rebanhos com doenças respiratórias, sendo o diagnóstico a referência exata para definir a

estratégia de controle (Caswell e Williams, 2007; Sobestiansky et al., 2007).

### 2.3 Antimicrobianos

A terapia antimicrobiana é largamente utilizada na suinocultura com funções terapêutica e profilática. A utilização desta ferramenta deve ser baseada na farmacodinâmica de cada droga assim como na biologia do microrganismo alvo. Para tal é necessário conhecer as classes de antimicrobianos disponíveis, pra fazer um uso racional destes em medicina veterinária, e o sucesso terapêutico é alcançado quando se utiliza a droga correta, na concentração e tempo corretos, sendo este um conceito essencial para técnicos (Borowski et al., 2002; Songer e Post, 2005).

De forma geral, dividem-se os antimicrobianos em bactericidas ou bacteriostáticos, baseado na propriedade de cessar o crescimento bacteriano. E dentro de cada grupo existem classes de antimicrobianos, onde cada uma possui um mecanismo de ação diferente. As drogas bactericidas são capazes de matar as bactérias alvo. Dentro deste grupo, encontram-se as classes dos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e fluorquinolonas. O grupo de bacteriostáticos é capaz de impedir a multiplicação bacteriana, porém em altas concentrações também são capazes de eliminar a bactéria. Neste grupo, observam-se as classes de tetraciclina, sulfonamidas, pleuromutilinas, lincosamidas, macrolídeos e o florfenicol (Songer e Post, 2005).

Diversos são os mecanismos de ação dos princípios ativos encontrados nos antimicrobianos. As classes de aminoglicosídeos, lincosamidas, florfenicol, macrolídeos, pleuromutilinas e tetraciclina agem inibindo a síntese protéica, através de ligação reversível ou não em alguma subunidade ribossomal, o que leva a falha na produção de proteínas. As fluorquinolonas

interferem da produção da enzima DNA-girase, que está diretamente envolvida na síntese e manutenção de DNA bacteriano. Já os beta-lactâmicos agem através da inibição da síntese de peptidoglicanos na parede celular em bactérias ainda em fase de multiplicação, e sulfonamidas inibem síntese de ácido fólico via competição com ácido para-aminobenzóico (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006).

Os aminoglicosídeos e fluorquinolonas têm ação contra bactérias gram-negativas e micoplasmas. Dentro do primeiro grupo, tem-se as seguintes drogas: amicacina, estreptomicina e gentamicina; e o segundo grupo é subdividido em gerações, sendo as de segunda e terceira gerações mais utilizadas atualmente. Norfloxacin é uma droga que pertence à segunda geração das fluorquinolonas, porém existem grandes limitações de seu uso, já que possui um pequeno espectro de ação devido a sua pouca capacidade de penetração em tecidos e fraca absorção via oral. As fluorquinolonas de terceira geração, como a enrofloxacin e ciprofloxacina, apresentam espectro de ação muito superior, com melhor capacidade de distribuição nos tecidos. A classe de Beta-lactâmicos é subdividida em penicilinas e cefalosporinas. O subgrupo das benzilpenicilinas inclui a penicilina G, com espectro de ação voltado para bactérias gram-positivas, e as aminobenzilpenicilinas, que inclui ampicilina e amoxicilina, que têm espectro de ação maior, que inclui também bactérias gram-negativas. As cefalosporinas são subdivididas em gerações, baseado na estrutura bioquímica da droga e atividade antibacteriana, sendo as de terceira geração mais amplamente utilizadas a campo, por exemplo, o ceftiofur, com melhor indicação contra bactérias gram-negativas, portanto com boas indicações para uso em doenças respiratórias de suínos (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006).

O florfenicol é um análogo sintético do cloranfenicol, e possuem mecanismo de ação semelhante. Entretanto o florfenicol possui um átomo de flúor em sua molécula, que auxilia na evasão ao mecanismo de resistência de bactérias ao cloranfenicol, porém sem os efeitos colaterais relacionados a este último, e de uso liberado dentro da medicina veterinária. São efetivos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006). Dentro das lincosamidas, uma droga de amplo uso na suinocultura é a lincomicina, porém esta apresenta um espectro de ação limitado, tendo melhor efetividade contra bactérias gram-positivas (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006). Os macrolídeos possuem propriedades em comum com as drogas do grupo das lincosamidas. Neste grupo estão a eritromicina, tilosina, tylvalosina, leucomicina e tilmicosin, e estes possuem efetividade contra gram-positivos aeróbios e anaeróbios e micoplasmas, no entanto não apresentam boa eficácia perante bactérias gram-negativas aeróbias (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006). De qualquer forma, a tilosina e o tilmicosin são muito utilizados na suinocultura, sendo o segundo indicado inclusive para doenças respiratórias de suínos, assim como a tiamulina, do grupo das pleuromutilinas, que tem boas indicações para doenças respiratórias e entéricas de suínos (Songer e Post, 2005).

O grupo das sulfonamidas possuiu um amplo espectro de ação, porém hoje em dia relata-se um uso limitado, devido à seleção de inúmeras linhagens bacterianas resistentes a estes compostos, porém pode-se associá-las ao trimetoprim, e com ação sinérgica, potencializa a ação das sulfonamidas, ampliando o espectro para bactérias gram-positivas e gram-negativas. As tetraciclina, que inclui clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e outros, possuem ação contra bactérias gram-

positivas e gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, e micoplasmas (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006).

Os mecanismos de resistência são respostas evolutivas desenvolvidas pelas bactérias e podem ser classificados como constitutivos ou intrínsecos, ou seja, propriedade natural da bactéria de não susceptibilidade ao mecanismo de ação de certos princípios ativos, ou adquiridos, que são os mais relevantes epidemiologicamente. Em geral, estes são originados de mutações cromossômicas ou aquisição horizontal de elementos genéticos que as torna resistentes, e a partir daí inicia a multiplicação de uma linhagem bacteriana resistente a certo composto antimicrobiano (Songer e Post, 2005).

No Brasil, Borowski et al. (2002) avaliaram a sensibilidade de isolados de *P. multocida* obtidos de casos de pleuropneumonia suína no estado do Rio Grande do Sul, e observaram maior porcentagem de sensibilidade ao composto amoxicilina, seguida por ceftiofur e tilmicosin. As maiores taxas de resistência foram observadas em relação à espectinomicina, seguida por neomicina e enrofloxacin. Heres (2009) demonstrou no mesmo estado maior taxa de resistência à oxitetraciclina, e nenhuma resistência foi observada à enrofloxacin e ceftiofur. Em Santa Catarina, Rebelatto et al. (2011) relatam maior sensibilidade em relação ao ceftiofur, sulfazotina, trimetoprima e florfenicol, e menores taxas em relação à clindamicina e penicilina. Em um surto de pasteurelose em suínos de terminação no Mato Grosso, Silva et al. (2009) observaram que a enrofloxacin, penicilina, ciprofloxacina e norfloxacina apresentaram maiores taxas de sensibilidade, a sulfonamida apresentou taxa intermediária, e não houve nenhum isolado sensível à lincomicina. Em Minas Gerais, um laboratório de diagnóstico avaliou isolados de *P. multocida* do período de 2007

a 2011, e demonstrou maior sensibilidade frente ao ceftiofur, florfenicol, amoxicilina, doxiciclina, espectinomicina e tulatromicina. As menores taxas de sensibilidade foram percebidas em relação à lincomicina e sulfadiazina (Maciel et al., 2011).

Existem poucos trabalhos científicos que determinam ao certo o mecanismo de resistência de linhagens de *P. multocida*, e poucos são os trabalhos que relatam a avaliação de susceptibilidade de isolados de campo regionalmente sendo a maioria relatos de congressos, visto que faltam pesquisas científicas aprofundadas neste assunto.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização do experimento

O experimento foi conduzido no laboratório de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### 3.2 Amostragem

Coletaram-se amostras provenientes de 28 diferentes rebanhos. No total, avaliou-se 44 pulmões, sendo 25 amostras clínicas, oriundos de 14 rebanhos diferentes (14/28; 50%), e 19 pulmões coletados em frigorífico, oriundos de outros 14 rebanhos (14/28; 50%). As amostras clínicas são provenientes de rebanhos com histórico de doença respiratória, algumas com diagnóstico prévio de pasteurelose pulmonar. Para a coleta, foram realizadas visitas em seis granjas pré-selecionadas por contato prévio com médicos veterinários responsáveis técnicos pelas propriedades, que relatavam mortalidade de animais de terminação, devido à doença respiratória. Em cada uma, coletaram-se amostras de um

a três animais, com idade superior a 110 dias, com sinais clínicos típicos de distúrbios respiratórios, como dispneia, secreção nasal, tosse, relutância em se locomover, cianose de focinho e orelhas, e, preferencialmente, animais que não tivessem sido medicados com antimicrobianos. Ainda, para compor as amostras clínicas, foram incluídos no estudo casos recebidos, de oito granjas com o mesmo perfil, para diagnóstico no Laboratório de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

As amostras coletadas ao abate foram obtidas em frigorífico localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, e foram coletados de um a três pulmões por lote de rebanho abatido.

Foram incluídos na avaliação, somente rebanhos onde se obteve isolamento em cultura pura de *P. multocida* dos pulmões coletados. Amostras com isolamento bacteriano misto ou que não apresentaram nenhum crescimento bacteriano foram excluídas do estudo. Como critério para análise estatística, utilizaram-se somente pulmões que apresentaram área de pneumonia com extensão igual ou superior a 34% em relação à área total do órgão, segundo Halbur et al. (1995). Cada origem foi identificada sequencialmente, de E01 a E29, seguido do número que identifica o animal amostrado. As amostras do rebanho E27 foram eliminadas devido à caracterização bioquímica ter revelado não se tratar de *P. multocida* (**Tabela 1**).

1

**Tabela 1:** Listagem de rebanhos amostrados nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso, subdivididos pela origem das amostras.

Amostras	Origem	Rebanhos
Abate	Frigorífico	E04, E05, E06, E07, E17, E19, E20, E21, E22, E23, E24, E25, E26, E28.
Clínicas	Visita	E01, E03, E09, E10, E11, E29.
	Diagnóstico	E02, E08, E12*, E13 <sup>§</sup> , E14*, E15 <sup>§</sup> , E16*, E18.

\*Amostras provenientes de São Paulo; §Amostras provenientes de Mato Grosso.

### 3.3 Coleta e remessa de material

Os animais selecionados para a coleta de amostras clínicas nas propriedades visitadas foram eutanasiados, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA-111/11). Em seguida, foram necropsiados e coletados pulmões, coração e traqueia, evitando manipulação excessiva e contato com superfícies contaminadas. Quando se observou a presença de exsudato livre na cavidade torácica ou pericárdica, este material foi coletado utilizando-se seringas ou suabes estéreis.

Todas as amostras foram coletadas em saco plástico limpo, e imediatamente refrigeradas, para envio ao laboratório e

processamento em um prazo máximo de 24 horas. O mesmo procedimento de remessa foi adotado para as coletas realizadas no frigorífico. Todas as amostras clínicas enviadas para diagnóstico chegaram corretamente acondicionadas, refrigeradas, e em um prazo máximo de 48 horas após a coleta.

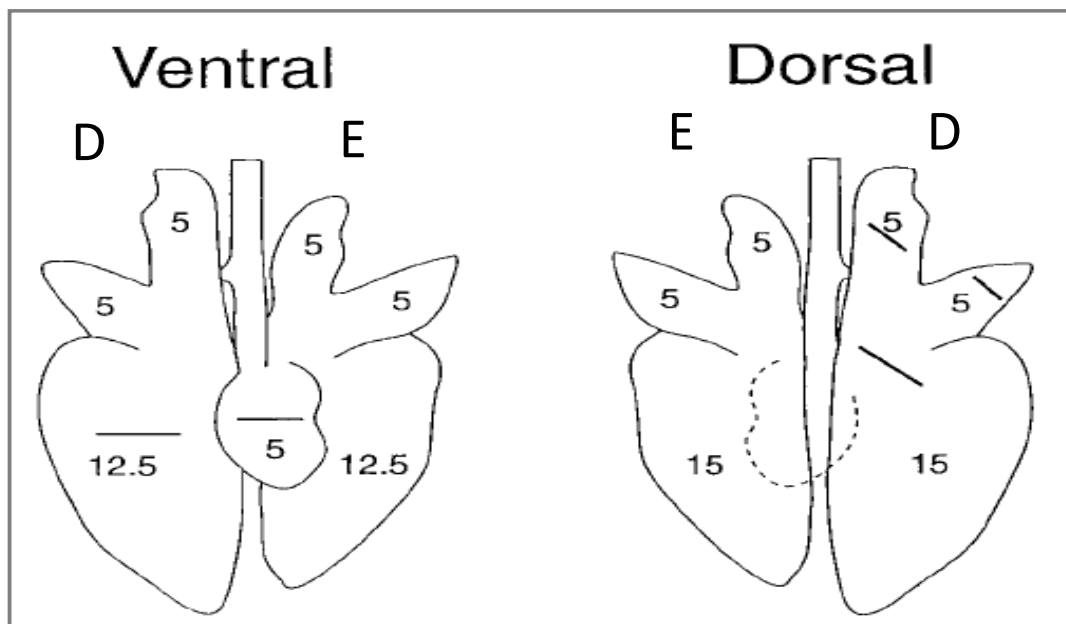
### 3.4 Processamento das amostras

Após chegada ao laboratório, todas as amostras foram inicialmente identificadas e fotografadas. Em seguida, foram avaliadas quanto ao tipo de lesão observada macroscopicamente. Nos pulmões, foram descritas a extensão e distribuição das áreas de consolidação, presença de áreas de necrose, hemorragia e abscessos. Quando se

observou consolidação, realizou-se um cálculo de estimativa da área total

1

acometida, segundo Halbur et al. (1995) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática de avaliação macroscópica de pulmões, onde cada lobo pulmonar recebe uma pontuação de área acometida em relação a pontuação de área total, totalizando 100 pontos, segundo Halbur et al. (1995). (D – lado direito; E – lado esquerdo).

As alterações na pleura foram devidamente avaliadas e descritas, como aspecto geral, espessura, coloração e deposição de exsudato na superfície. Os linfonodos mediastínicos foram avaliados quanto à coloração e ao tamanho, sendo classificados como normal, linfadenomegalia discreta, moderada ou acentuada. No coração, foram consideradas a presença de alterações no epicárdio e saco pericárdico, acúmulo de material no interior de saco pericárdico, e possível presença de aderência destes entre si e à tecidos adjacentes.

### 3.4.1. Cultivo e Isolamento Bacteriológico

Após avaliação macroscópica de cada pulmão, foram selecionadas duas regiões com lesões de consolidação evidentes. Todo

o processamento foi realizado em bancada bacteriológica de uso exclusivo, com auxílio de um bico de Bunsen. A superfície de cada área escolhida foi flambada, utilizando-se uma espátula metálica aquecida no fogo. Em seguida, utilizando-se lâmina de bisturi e pinça estéreis, retirou-se um fragmento de 1 cm<sup>3</sup>, com imediata semeadura, por impressão do fragmento em placas de Ágar MacConkey<sup>1</sup> (MCK) e Ágar Casman Base<sup>2</sup> acrescido de 5% de sangue ovino desfibrinado (ASA). Nas placas de ASA era realizada estria única de *Staphylococcus aureus*, fornecedor de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), para o crescimento de microrganismos com esta exigência, como

<sup>1</sup> BD DIFCO™, Agar MacConkey, Catalogo 212123, New Jersey, EUA

<sup>2</sup> BD BBL™, Casman Agar Base, Catalogo 211106, New Jersey, EUA

*A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis* (fenômeno de satelitismo). O mesmo procedimento foi realizado em áreas com outros tipos de lesões, tais como pleurite e pericardite, em especial naquelas onde se observou exsudação de fibrina. As placas de ASA foram incubadas em jarra bacteriológica, a 37° Celsius (C), em ambiente de microaerofilia, obtido com uma vela acesa no interior da jarra hermeticamente fechada. As placas de MCK foram incubadas em aerobiose, também a 37°C. Todas as placas foram avaliadas após 36 e 60 horas de incubação, para verificação de crescimento bacteriano.

### 3.4.2 Identificação dos isolados

À avaliação das placas, todas as colônias observadas foram avaliadas quanto à morfologia, e submetidas a provas bioquímicas apropriadas, como descrito por Quinn et al. (1994), para identificação dos isolados. Os testes utilizados foram: prova da catalase, através da observação de borbulhamento em água oxigenada comum; teste da oxidase, através de reação em tira<sup>3</sup>; utilização da ureia, através da reação em Caldo Ureia<sup>4</sup>, produção de H<sub>2</sub>S, formação de indol e motilidade, através do meio de SIM<sup>5</sup> e coloração de Gram<sup>6</sup>. Quando confirmado crescimento de *P. multocida*, foram realizadas as provas fenotípicas da hialuronidase (Carter e Rundell, 1975) e acriflavina (Carter e Subronto, 1973), para determinação dos subtipos capsulares A e D, respectivamente.

As provas de utilização de carboidratos foram realizadas pelo laboratório de bacteriologia da EMBRAPA Suínos e Aves,

<sup>3</sup> LABORCLIN™, Tiras de Oxidase, Código 570661, Paraná, Brasil

<sup>4</sup> BD DIFCO™, Urea Broth, Catálogo 227210, New Jersey, EUA

<sup>5</sup> HIMEDIA™, Meio SIM, Referência M181-500g, Paraná, Brasil

<sup>6</sup> LABORCLIN™, Kit Coloração de Gram, Paraná, Brasil

em Concórdia, Santa Catarina, como parte de um projeto de colaboração maior, segundo protocolo próprio. Testou-se a fermentação dos substratos sorbitol, salicina, rafinose, arabinose, maltose, sacarose, lactose, xilose, glicose, trealose, monose, esculina, dulcitol, manitol e nitrato.

### 3.4.3 Sensibilidade antimicrobiana

Todas as amostras isoladas e identificadas como *P. multocida* foram repicadas em caldo de enriquecimento *Brain-Heart-Infusion* (BHI)<sup>7</sup>, na concentração 0,5 da escala de MacFarland. Em seguida, foram submetidas a teste de sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de disco difusão em Ágar Muller-Hinton<sup>8</sup>, como descrita por Bauer et al. (1966). A escolha das drogas foi baseada no uso extensivo a campo, sendo as seguintes selecionadas: amoxicilina (10µg)<sup>9</sup>, ceftiofur (30µg)<sup>9</sup>, ciprofloxacina (5µg)<sup>9</sup>, doxiciclina (30µg)<sup>9</sup>, enrofloxacin (5µg)<sup>9</sup>, espectinomicina (100µg)<sup>9</sup>, florfenicol (30µg)<sup>9</sup>, gentamicina (10µg)<sup>9</sup>, lincomicina (10µg)<sup>10</sup>, norfloxacina (10µg)<sup>9</sup>, penicilina G (10U)<sup>9</sup>, sulfonamida (25µg)<sup>9</sup>, tetraciclina (30µg)<sup>9</sup>, tiamulina (30µg)<sup>11</sup> e tilmicosina (15µg)<sup>9</sup>. A avaliação dos halos de sensibilidade foi realizada de acordo com instruções dos fabricantes, sendo classificadas como sensíveis, parcialmente sensíveis e resistentes. Para efeito de contabilização final, amostras parcialmente sensíveis foram consideradas resistentes.

### 3.4.4. Processamento Histológico

Fragmentos de 2 cm<sup>3</sup> foram coletados de todos os pulmões, selecionando áreas com lesões aparentes, tais como consolidação,

<sup>7</sup> BD BACTO™, Brain Heart Infusion, Catalogo n° 237500, New Jersey, USA

<sup>8</sup> HIMEDIA™, Muller Hinton Agar, Mumbai, India

<sup>9</sup> SENSIFAR-VET CEFAR®, São Paulo, Brasil

<sup>10</sup> DME® Sensidisc

<sup>11</sup> Novartis

abscessos, pleurite, além de fragmentos de linfonodos mediastínicos e bronquiais. Coletou-se ainda coração, porém somente aqueles com lesões macroscópicas, como pericardite. Estes foram fixados, por um período de 72 horas, em solução de formol tamponado a 10%, e, posteriormente, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, seguido de microtomia e coloração histológica pela técnica de Hematoxilina e Eosina (Luna, 1968). Todas as lâminas foram avaliadas à microscopia óptica, seguindo critérios previamente padronizados (**Anexo I**).

### 3.4.5. Imuno-histoquímica

Todas as amostras coletadas foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de antígeno de *M. hyopneumoniae*, PCV2 e Influenza tipo A. Utilizando-se o mesmo processamento histológico previamente citado, foram obtidas seções de 3µm dos tecidos parafinizados em lâminas silanizadas, para execução da IHQ pelo método da streptavidina<sup>12</sup> marcada com peroxidase e solução de cromógeno amino-etil-carbazol<sup>13</sup> (AEC). O protocolo utilizado foi o mesmo para PCV2 e Influenza (**Anexo II**), porém para o primeiro, foi dada preferência a fragmentos de linfonodos e pulmões, e foi utilizado anticorpo policlonal leporino anti-PCV2 na diluição de 1:800 (Souza et al., 2008). Para Influenza, foram utilizados fragmentos de pulmões e traqueia, e utilizou-se anticorpo monoclonal anti-Influenza A<sup>14</sup> (anti-nucleoproteína, clones A1, A3 Blend), na diluição de 1:1000, segundo Haines et al. (1993) e Vincent et al. (1997). Considerou-se positivas amostras com marcação em vermelho no citoplasma de linfócitos e histiócitos, no caso de IHQ

para PCV2. Para Influenza, a marcação positiva em vermelho foi verificada no citoplasma de células epiteliais de brônquios, bronquíolos e de glândulas peribronquiais, e também em células epiteliais de revestimento e glândulas de submucosa na traquéia. Em todas as baterias de IHQ foram incluídos controles positivos e negativos.

A IHQ para detecção de *M. hyopneumoniae* foi realizada no laboratório de Patologia na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, Santa Catarina), segundo protocolo próprio, como parte de um projeto de colaboração mais abrangente, utilizando para tal anticorpo policlonal anti-proteína p36. As marcações positivas foram observadas em vermelho no epitélio de vias aéreas, e foram classificadas segundo a intensidade em leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

### 3.5 Análise Estatística

As amostras foram avaliadas estatisticamente, com relação à presença de lesões macroscópicas e microscópicas, e diferenças entre amostras clínicas, coletadas em granjas, e amostras oriundas de coletas em frigorífico, pelo teste Exato de Fisher, para análise de distribuição de frequências, de acordo com o tamanho amostral. Todas as análises foram executadas pelo programa *Statistix*, versão 2.0, com significância de 95% ( $p < 0,05$ ). A extensão de área de pneumonia de amostras clínicas e de frigorífico foi avaliada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, com significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

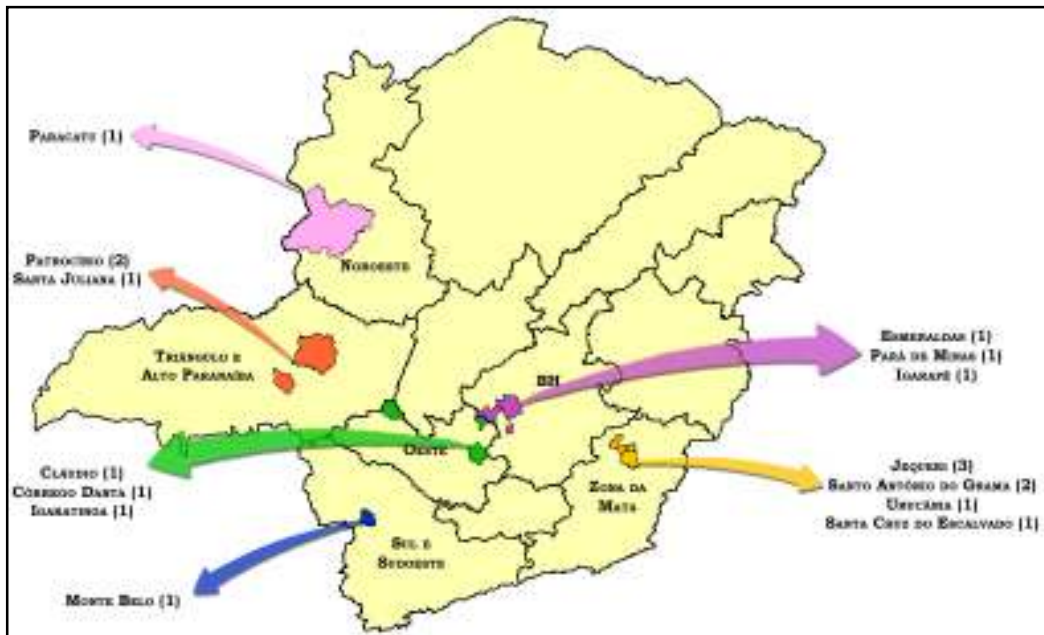
### 4.1 Amostragem

Três rebanhos são localizados no estado de São Paulo, dois no Mato Grosso e todos os demais em Minas Gerais. As amostras obtidas de Minas Gerais (23/28; 82,1%) foram provenientes da Zona da Mata (07/23;

<sup>12</sup> Dako LSAB+ System –HRP Biotinnylated, cat n° K0690, INVITROGEN, Carpinteria, USA

<sup>13</sup> Dako, Corporation, AEC Substrate-Chromogen, cat n°. K3464, INVITROGEN, Carpinteria, USA

<sup>14</sup> Millipore, Billerica, MA



**Figura 2:** Mapa de localização dos municípios dos rebanhos incluídos no experimento, em cada mesorregião do estado de Minas Gerais. Foram avaliadas amostras de 28 rebanhos, entretanto, em cinco rebanhos não foi possível a obtenção do município de origem.

30,4%), da região metropolitana de Belo Horizonte (03/23; 13,1%), do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (03/23; 13,1%), da região Oeste (03/23; 13,1%), da região Sul (01/23; 4,3%), e da região Noroeste (01/23; 4,3%) (**Figura 2**). Em cinco rebanhos mineiros amostrados em frigorífico (05/23; 21,7%) não foi possível obter informações de origem na data da coleta no frigorífico.

## 4.2 Isolamento Bacteriológico

### 4.2.1 Identificação de isolados

Houve o isolamento de *P. multocida* em 44 pulmões, assim como de pleura em quatro casos, epicárdio em dois casos, e a partir do exsudato livre na cavidade pleural em dois casos.

Foram identificadas como *P. multocida* as colônias de crescimento exclusivo em ASA, de tamanho médio, cor branco-acinzentada, com aspecto mucóide, odor adocicado, não

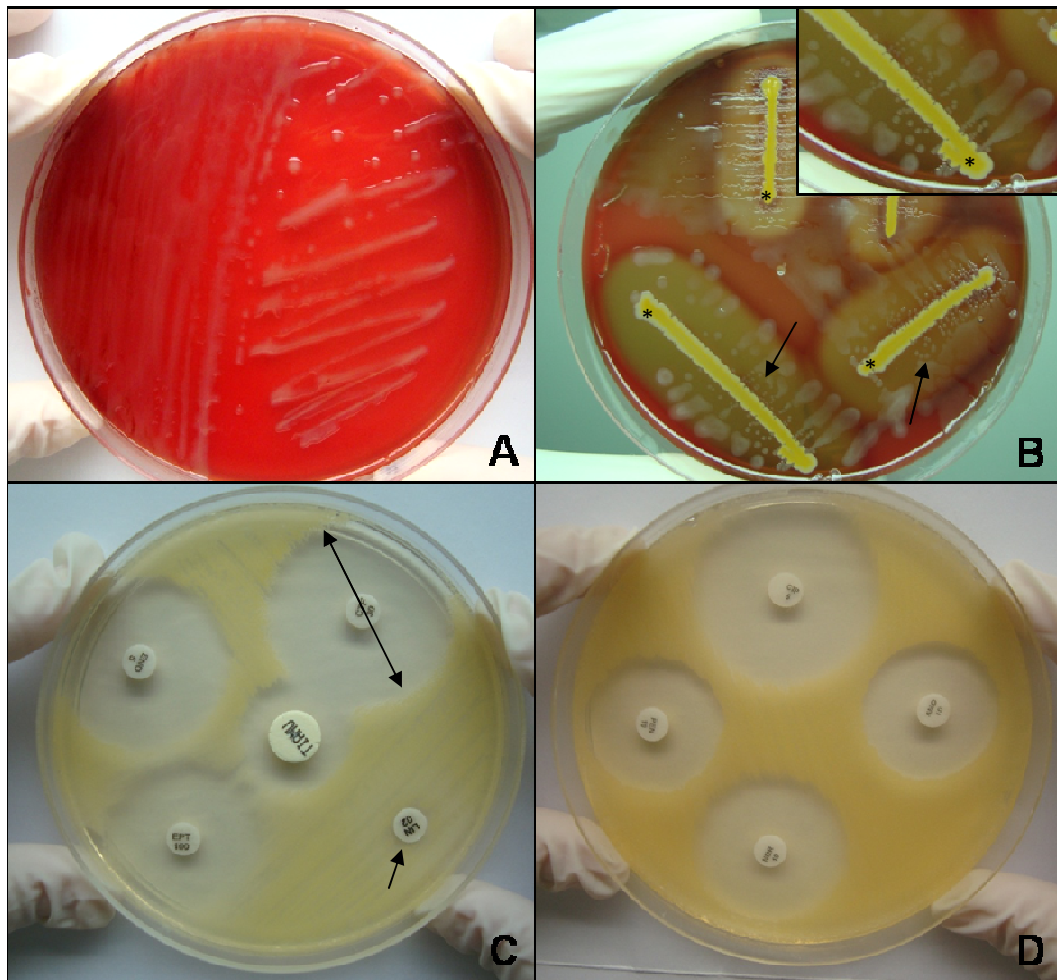
hemolítica e que não apresentaram satelitismo. Estas foram submetidas às provas bioquímicas previamente citadas, e identificadas como tal àquelas que demonstraram o seguinte resultado: catalase positiva, oxidase positiva, urease negativa, indol positiva, ausência de produção de H<sub>2</sub>S e ausência de motilidade (Quinn et al., 1994). O tipo capsular mais frequente foi o tipo A (90,9%), e o tipo D foi encontrado somente em quatro amostras (9,1%), oriundas de dois rebanhos diferentes, ambos obtidos em frigorífico (E04.1, E04.2, E04.3 e E21.1) (**Figura 3 A, B**).

A avaliação de utilização dos carboidratos foi realizada somente nos 44 isolados de pulmão, não sendo possível avaliar os isolados de pleura, pericárdio e líquido cavitário. Nenhum isolado fermentou dulcitol (0/44; 0%), e 43 fermentaram sorbitol (43/44; 97,7%), portanto, foram classificadas como *P. multocida* subespécie *multocida*, de acordo com o tipo de

classificação proposta por Quinn et al. (1994) e Davies (2004). Um único isolado, obtido de granja (E29.3) (1/44; 2,3%) não fermentou sorbitol nem dulcitol, e foi classificado como *P. multocida* subespécie *septica*, segundo Davies (2004).

Em nenhum isolado observou-se a presença

de gelatinase, assim como nenhum isolado fermentou arabinose e lactose. Entretanto, todos fermentaram sacarose, glicose, monose e manitol. A fermentação de xilose, trealose, salicina, rafinose, esculina e maltose foi variável, ou seja, alguns isolados fermentaram e outros não, assim como a transformação de nitrato em nitrito também foi variável em um isolado.



**Figura 3:** **A:** *Pasteurella multocida* tipo A: colônias médias, acinzentadas, de aspecto mucóide, não hemolíticas (Ágar sangue - ASA). **B:** Teste da hialuronidase: placa de ASA com colônias de *P. multocida* tipo A e estria de *Staphylococcus aureus* (\*). Nota-se morfologia de colônias de *P. multocida* de menor tamanho, quando localizadas próximo à estria (seta). **C e D:** Sensibilidade a antimicrobianos (teste de disco difusão em Ágar Müller-Hinton): enrofloxacina (ENO), ceftiofur (CTF), tiamulina (TIAMU), espectinomicina (EPT), lincomicina (LIN), ciprofloxacina (CIP), amoxicilina (AMO), penicilina (PEN), norfloxacina (NOR). Nota-se ao redor de cada disco, halo de ausência de crescimento bacteriano (seta longa), exceto para lincomicina (seta curta), onde houve crescimento bacteriano ao redor de todo o disco, indicando resistência ao princípio ativo.

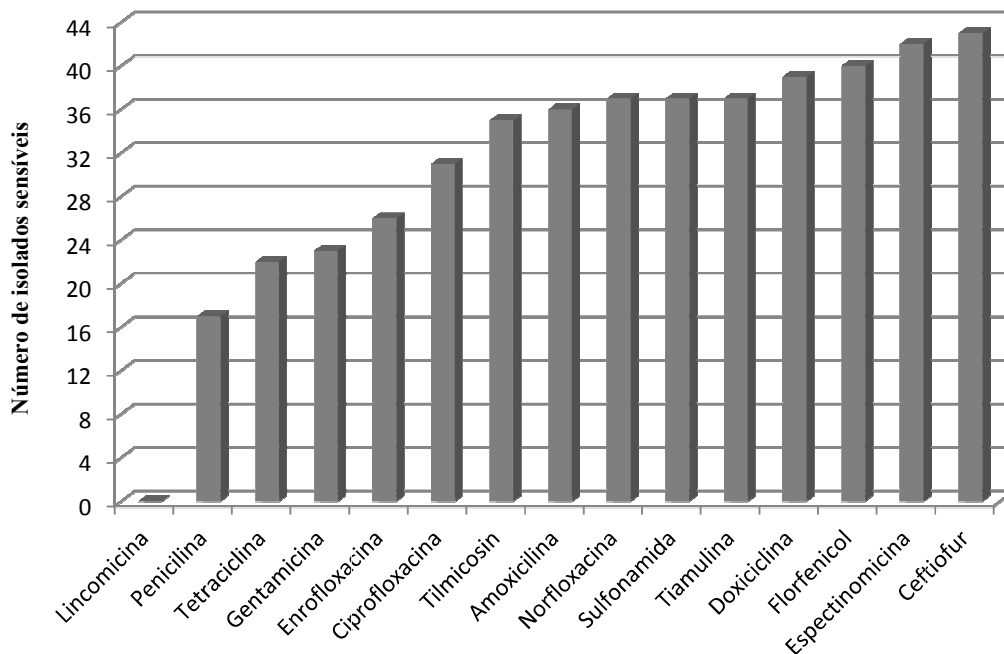
#### 4.2.2 Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos

A avaliação de sensibilidade a antimicrobianos realizada nos 44 isolados de pulmões demonstrou que o ceftiofur foi a droga que apresentou a maior taxa de sensibilidade (43/44; 97,7%), seguido de espectinomicina (42/44; 95,4%) e florfenicol (40/44; 90,9%). As drogas que demonstraram menores taxas de sensibilidade foram lincomicina, com nenhum isolado sensível (0/44; 0%); seguida da penicilina (17/44; 38,6%) e gentamicina (23/44; 52,3%). As taxas de sensibilidade dos 44 isolados de pulmões, em relação a cada droga avaliada, são demonstradas na **Figura 4** e ilustradas na **Figura 3 C, D**.

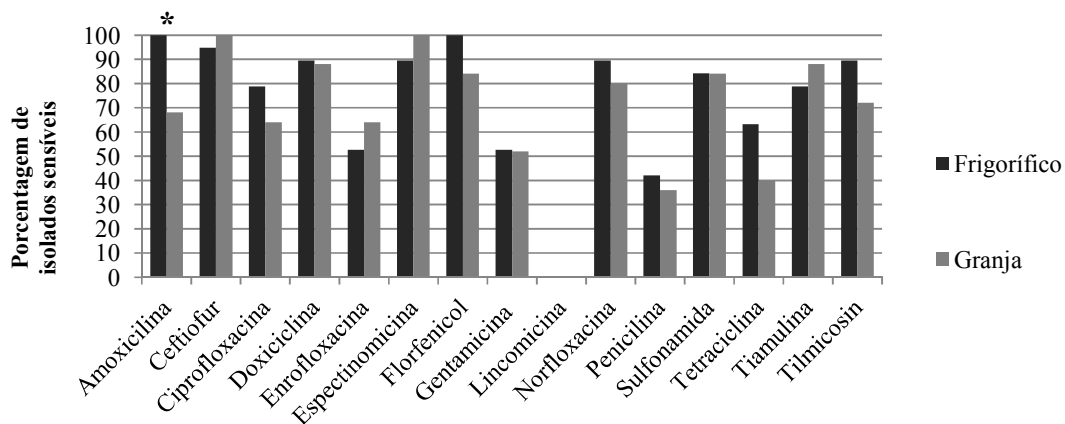
Um isolado de amostra clínica (E15.1) foi sensível a somente três drogas, um isolado de amostra coletada de frigorífico (E05.1) foi sensível a quatro drogas, e um isolado de

amostra clínica (E15.2) foi sensível a cinco drogas. Vinte isolados apresentaram resistência de cinco a 12 drogas. Três isolados foram sensíveis a 14 drogas, sendo um de amostra clínica (E01.2) e dois de amostras de frigorífico (E12.1 e E23.1).

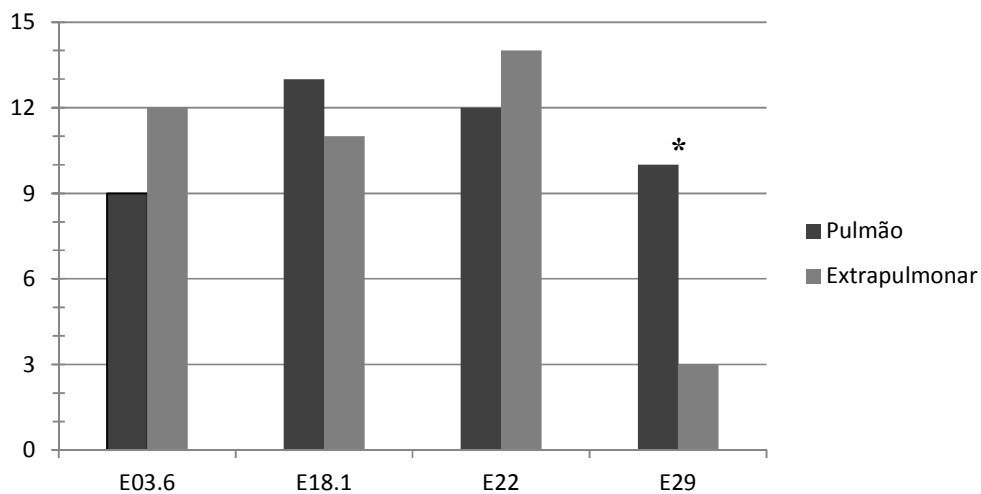
Na **Figura 5**, observa-se o perfil de sensibilidade das amostras clínicas e de frigorífico. Houve diferença de sensibilidade antimicrobiana entre cepas isoladas de pulmões destes dois grupos somente no caso da Amoxicilina ( $p < 0,05$ ), já que houve maior resistência em cepas isoladas de amostras clínicas. O perfil de sensibilidade dos quatro isolados obtidos em pleura (E03.6; E18.1; amostras clínicas), pericárdio (E22.1; frigorífico) e líquido cavitário (E29.1; amostra clínica), é demonstrado na **Figura 6**, onde comparou-se estes resultados com o perfil de sensibilidade dos isolados de pulmão, respectivamente em cada caso.



**Figura 4:** Perfil de sensibilidade das 15 drogas avaliadas frente aos 44 isolados de *Pasteurella multocida* obtidos de pulmões.



**Figura 5:** Porcentagem de isolados sensíveis a cada um dos 15 antimicrobianos testados, comparativamente entre amostras clínicas (n=25) e de frigorífico (n=19). \* diferença estatística significativa entre amostras clínicas e de frigorífico, para  $p < 0,05$ .



**Figura 6:** Comparação do perfil de sensibilidade de isolados de *Pasteurella multocida* obtidos de pulmão e extrapulmonar, em quatro amostras, frente a 15 antimicrobianos. \* diferença estatística significativa, para  $p < 0,05$ , entre isolado de pulmão e extrapulmonar, respectivamente em cada caso.

### 4.3 Alterações anatomopatológicas

#### 4.3.1 Macroscopia

##### 4.3.1.1 Pulmões

À avaliação macroscópica, a lesão mais observada foi de pneumonia, com áreas de consolidação com distribuição crânio-ventral, observadas em 43 dos 44 (97,7%) pulmões analisados (**Figura 7 A, B**). Nestas, os lobos apicais e intermediários, direitos e esquerdos, e lobo acessório apresentavam-se de consistência firme, coloração vermelho-escuro, e ao corte fluía secreção viscosa de coloração brancacenta. A média geral de área de pneumonia observada foi de 48%, com mínimo de 8% e máximo de 90% de comprometimento. Amostras coletadas em frigorífico apresentaram extensão de pneumonia com mínimo de 8% e máximo de 80%, média de 41% de área comprometida e 40% de mediana, inferior ao observado em amostras provenientes de granjas ( $p=0,0408$ ), que apresentaram média de 54% e mediana de 55%, com mínimo de 20% e máximo de 90%, em animais com idade entre 90 a 170 dias. A única amostra em que não se observou pneumonia (E11.1) pertencia a um animal oriundo de granja (amostra clínica), que apresentava sinais clínicos respiratórios típicos, e à necropsia apresentou pleurite fibrinosa difusa aguda grave, associado à áreas multifocais de aderência entre pleuras parietal e visceral e formação de abscessos extrapulmonares, adjacentes à pleura e pericárdio, com aderência de todos estes tecidos entre si, além de material purulento livre na cavidade torácica. Neste caso, foi isolada *P. multocida* de pulmão, pleura, pericárdio, abscessos e do exsudato purulento livre na cavidade torácica, apesar da ausência de pneumonia à macroscopia. Ainda, este animal apresentou exsudação de fibrina na cavidade abdominal, com deposição de fibrina sobre baço, fígado e entre as alças intestinais, porém não foi possível o isolamento a partir destes locais.

Em todos os casos, observou-se secreção catarral no lúmen das vias aéreas inferiores. Em 15 amostras (15/44; 34,1%) a pleura apresentava-se espessa, rugosa e de cor brancacenta, com distribuição difusa a multifocal, caracterizadas como pleurite. Em nove havia deposição de fibrina (E01.1, E03.6, E10.3, E11.1, E18.1, E18.2, E18.3, E29.1, E29.2, todas amostras clínicas), em variados graus, caracterizadas como pleurite fibrinosa aguda, de onde foi possível o isolamento de *P. multocida* em quatro casos (**Figura 7C**). Ainda, observou-se aderência seca de pleura parietal em pleura visceral em cinco destes casos, o que sugere curso crônico, e foram caracterizadas como pleurisia (E03.6, E03.7, E08.1, E11.1, E18.2, amostras clínicas). Em três delas havia um padrão misto de acometimento, com áreas de pleurisia multifocais adjacentes a outros com deposição de fibrina. Houve diferença ( $p<0,05$ ) na avaliação da ocorrência de pleurite entre amostras clínicas e coletadas ao abate.

Outras alterações observadas foram abscessos pulmonares em seis casos (E01.1, E01.2, E12.1, amostras clínicas; E04.3, E07.3, E20.1, coletados em frigorífico) (**Figura 7G**), e um abscesso extrapulmonar, que envolvia pleuras parietal e visceral e saco pericárdico (E11.1, amostra clínica), sem diferença estatística de ocorrência entre os grupos. Áreas avermelhadas no parênquima pulmonar que se aprofundavam ao corte, sugestivas de hemorragia, foram encontradas em cinco amostras (E02.1, E03.6, E11.1, E14.1, amostras clínicas; E19.1, amostra de abate), onde também não houve diferença estatística significativa entre amostras clínicas ou de frigorífico.

Para efeito de avaliação estatística foram eliminadas oito amostras com área de pneumonia inferior a 34% da extensão total do pulmão, e conseqüentemente animais com idade inferior a 110 dias, sendo quatro amostras clínicas (E08.1, E09.1, E11.1,

E16.1), que eliminam três rebanhos (E08, E11, E16), e quatro amostras de frigorífico (E04.2, E04.3, E04.4, E06.2), que elimina somente um rebanho (E04). No total, contabilizaram-se 36 amostras, oriundas de 24 rebanhos (**Tabela 2**). Neste caso, a avaliação da extensão da área de pneumonia não mostra diferença significativa entre amostras clínicas e de frigorífico ( $p=0,0534$ ), entretanto, a ocorrência de pleurite mantém a significância estatística como mais frequente em amostras clínicas (**Tabela 2**).

#### 4.3.1.2 Outros órgãos

Pericardite foi observada em dez casos (10/44; 22,7%), sendo que duas estavam em estágio inicial, apresentando apenas espessamento do saco pericárdico, com discreto aumento da quantidade de material translúcido no interior, sugestivo de edema (E18.1; E18.3; amostras clínicas). Duas amostras apresentaram exsudação de fibrina (E03.6; E10.3; amostras clínicas) (**Figura 7 D, E e F**), e foram caracterizadas como pericardite fibrinosa aguda ou subaguda. Seis amostras demonstravam espessamento do pericárdio com aderência seca do saco pericárdico ao epicárdio, sugerindo cronicidade (E03.7, E08.1, E10.2, E16.1,

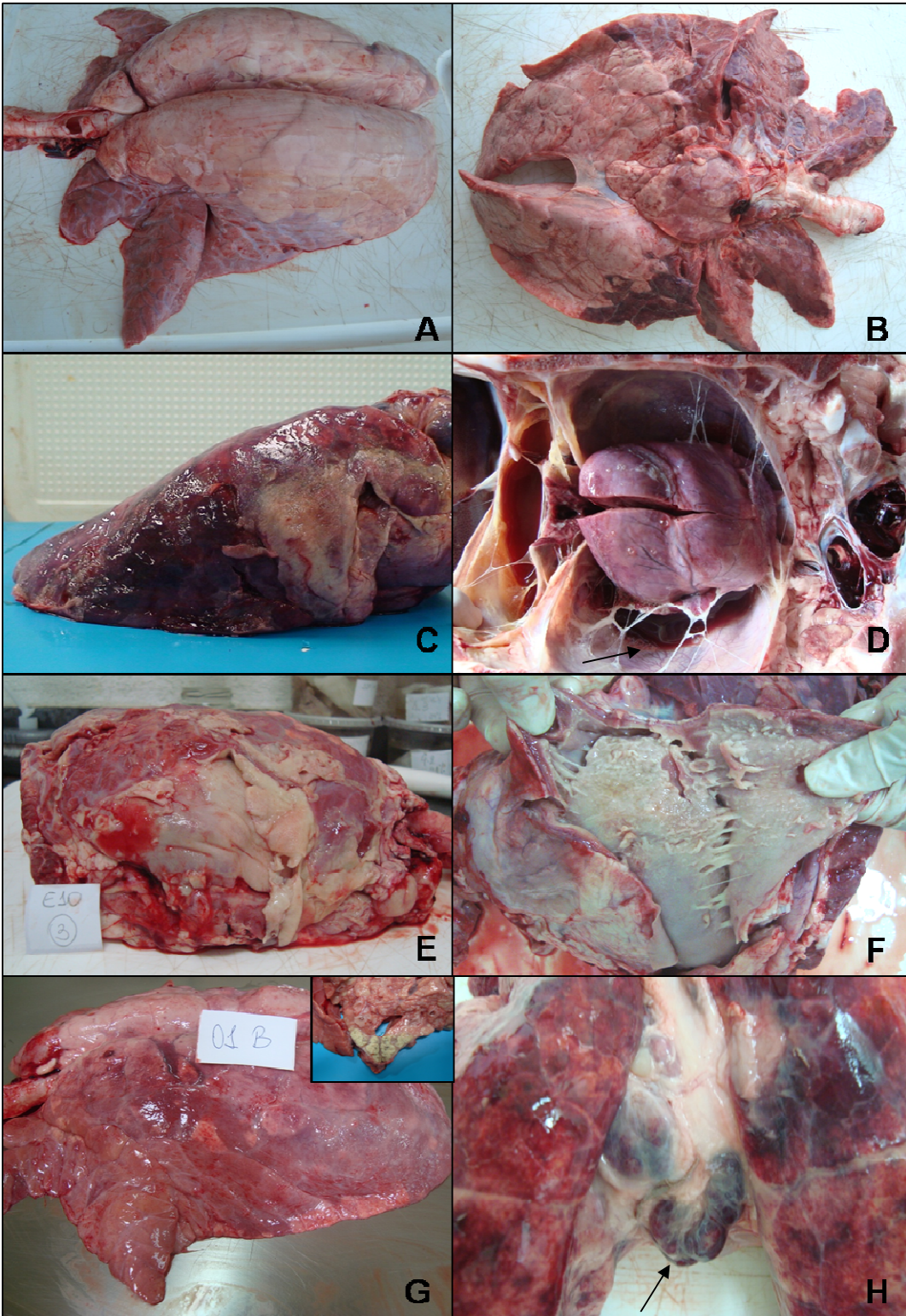
E18.2, clínicas; e E22.1, de frigorífico). Desta última (E22.1) foi possível obter isolamento da *P. multocida* do interior do saco pericárdico. Os casos de pericardite concentraram-se em amostras clínicas, mostrando apenas uma tendência numérica, sem significância estatística ( $p=0,1$ ).

Os linfonodos mediastínicos foram avaliados somente em 33 casos das 44 amostras coletadas, devido a dificuldades na coleta. Vinte e quatro linfonodos (24/33; 72,7%) apresentaram aumento de volume de moderado a acentuado (**Figura 7H**). A superfície de corte destes apresentava-se de cor marrom ou avermelhada, sugerindo estarem reativos. Dentro do critério de inclusão para análise estatística, foram avaliados somente 29 linfonodos, sendo 18 amostras clínicas e 11 amostras de abate, e 23 destas apresentaram aumento de volume. Observou-se diferença significativa ( $p=0,0185$ ) para a ocorrência de linfadenomegalia moderada a grave em amostras clínicas (**Tabela 2**). Linfadenomegalia discreta ou ausência de alterações nos linfonodos mediastínicos foram observadas em nove casos.

**Tabela 2:** Alterações macroscópicas em amostras clínicas e de frigorífico.

Amostras	Média Extensão Pneumonia <sup>‡</sup>	Abscesso	Hemorragia	Pleurite	Pericardite	Líquido Cavitário	Linfadenomegalia*
<b>Clínicas (n=21)</b>	58% <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>
<b>Frigorífico (n=15)</b>	48% <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>
<b>Total (n=36)</b>		5 (13,9%)	4 (11,1%)	13 (36,1%)	8 (22,2%)	1 (2,8%)	23 (79,3%)*

<sup>‡</sup> Cálculo da média da extensão de pneumonia, segundo Halbur et al. (1995). Foram excluídas amostras com extensão de pneumonia inferior a 34% da área total do órgão. \* Linfadenomegalia moderada a grave. Foram avaliados somente 29 linfonodos mediastínicos, sendo 18 oriundos de amostras clínicas, e 11 de frigorífico. **a,b:** em colunas, números seguidos de letras distintas, diferem estatisticamente entre si ( $p<0,05$ ), entre amostras clínicas e de frigorífico.



Em dois casos, observou-se exsudato na cavidade torácica, ambos em amostras clínicas. Em uma, de aspecto purulento (E11.1), e na outra, havia um líquido translúcido (E29.3). De ambos foi possível o isolamento de *P. multocida*.

#### 4.3.2 Histopatologia

A avaliação histopatológica dos 36 pulmões com extensão de pneumonia superior a 34%, revelou broncopneumonia neutrofílica em 29 amostras, caracterizada por reação inflamatória constituída predominantemente de neutrófilos, nos espaços alveolares e no lúmen de brônquios e bronquíolos. Ao redor destes e de vasos sanguíneos observou-se, além da presença de neutrófilos, também linfócitos, plasmócitos e histiócitos (29/36; 80,5%) (**Figura 8A**).

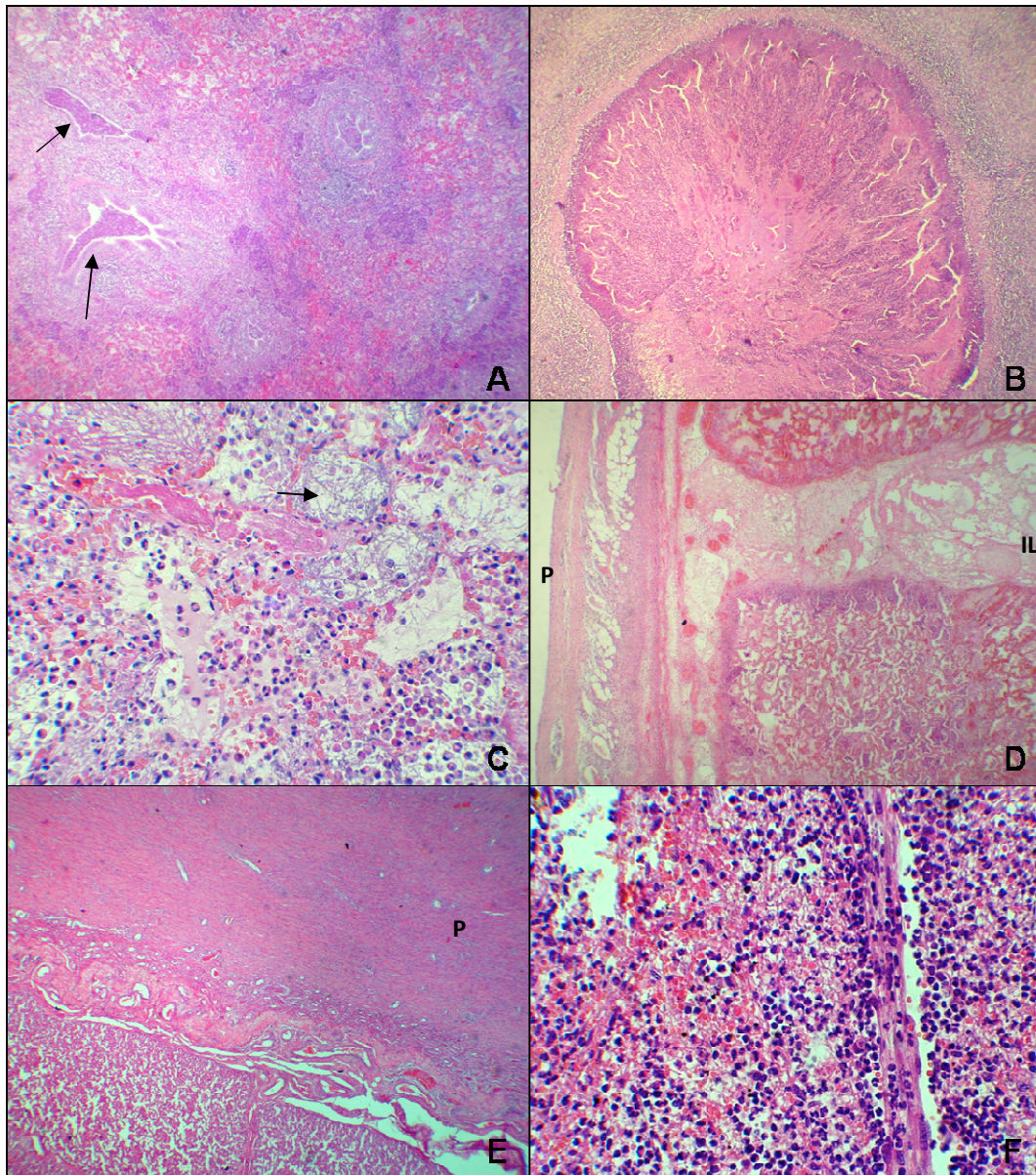
Cinco amostras (5/36; 13,9%) demonstraram um padrão misto de pneumonia (E02.1, E09.1, E10.2, E10.3, E14.1, amostras clínicas), onde se observou em alguns fragmentos pneumonia broncointersticial ou pneumonia intersticial linfocitárias, e em outros fragmentos do mesmo pulmão, broncopneumonia neutrofílica, porém a última sempre prevalecendo. Ainda, dois casos (2/36; 5,5%) apresentaram somente pneumonia broncointersticial (E05.1, coleta em frigorífico; E12.1, amostra clínica), ou seja infiltração inflamatória ao redor de brônquios e bronquíolos e em parede alveolar, porém sem envolvimento de lúmen das vias aéreas, e nestas o infiltrado inflamatório era predominantemente mononuclear, com linfócitos, histiócitos e

plasmócitos. Não houve diferença entre amostras clínicas e obtidas em frigorífico.

No lúmen de alvéolos foi possível observar alterações circulatórias marcantes, tais como: presença de material homogêneo e hialino, sugestivo de edema, em 94% dos casos; exsudação de fibrina, em 81%; e hemorragia, em 42%. As mesmas alterações foram observadas em espaços interlobulares, porém em menor frequência, sendo 64%, 58% e 22%, respectivamente, portanto, foi considerado curso agudo ou subagudo em 33 amostras (33/36; 91,7%) (**Figura 8C, D**). Em três (3/36; 8,3%) não havia alterações circulatórias marcantes, porém observou-se proliferação de fibroblastos em alvéolos e espaço interlobular, associada a áreas multifocais de necrose alveolar e de vias aéreas, o que sugere cronicidade.

Foi realizada uma caracterização específica do quadro inflamatório de vias aéreas, onde se avaliou a presença de infiltração inflamatória ao redor de brônquios e bronquíolos, em lâmina própria e ao redor das glândulas peribronquiais. Detectou-se bronquite e bronquiolite linfocitárias de moderada a grave em 25 casos (25/36; 69,4%), e discreta em oito (8/36; 22,2%). Não houve diferença estatística entre amostras clínicas ou coletadas em frigorífico (**Tabela 3**). O tecido linfóide broncoassociado (BALT – *Broncho-associated lymphoid tissue*) mostrou-se sem alterações em 17 casos, porém em 19 (19/36; 52,8%) havia hiperplasia de leve a moderada. Destes, oito eram amostras clínicas, e 11 de frigorífico,

**Figura 7:** **A:** Pneumonia crânio ventral – vista dorsal. Áreas de consolidação em lobos apicais. **B:** Pneumonia cranioventral – vista ventral. Áreas de consolidação em lobos apicais e ventral **C:** Pleurite fibrinosa em lobos apicais direito, associado à hemorragia em região dorsal do lobo diafragmático direito (amostra E03.6). **D:** Pericardite fibrinosa, com acúmulo de quantidade moderada de exsudato avermelhado com grumos de fibrina (seta) (amostra E03.6). **E:** Pulmão: Pleurite e pericardite fibrinosas grave, com aderências de folhetos pericárdicos (amostra E10.3). **F:** Pericardite fibrinopurulenta subaguda grave, com áreas de aderências entre saco pericárdico e epicárdio (amostra E10.3). **G:** Pulmão: Área de consolidação cranioventral, com abscesso em lobo médio esquerdo (detalhe) (amostra E01.2). **H:** Linfonodo mediastínico: Linfadenomegalia acentuada (seta).



**Figura 8:** **A:** Broncopneumonia: Intensa infiltração inflamatória em espaço alveolar e ao redor de brônquios e bronquíolos. Lúmen das vias aéreas repleto de células inflamatórias e restos celulares (seta). Intensa congestão. HE, 40X. **B:** Bronquiectasia: extensa área de necrose de bronquíolo, com restos celulares e grumos bacterianos no centro, e infiltração celular ao redor da área de necrose (amostra E01.1). HE, 40X. **C:** Pulmão: Infiltração neutrofílica, edema e fibrina (seta) em espaço alveolar. Intensa congestão. HE, 200X. **D:** Pulmão e pleura: Pleurite fibrinosa aguda. Intensa exsudação de fibrina e presença de edema em espaço interlobular (IL), espaço subpleural e pleura (P). Intensa congestão. HE, 200X. **E:** Pleurite crônica (E11.1). Acentuado espessamento de pleura (P), com intensa proliferação de fibroblastos. HE, 40X. **F:** Linfonodo mediastínico: Linfadenite neutrofílica fibrino-hemorrágica aguda grave. Intensa infiltração neutrofílica, associada à intensa exsudação de fibrina e hemorragia multifocal (amostra E18.2). HE, 200X.

havendo diferença significativa entre elas ( $p=0,0489$ ) (**Tabela 3**). Em nenhuma amostra observou-se hiperplasia de BALT acentuada.

Bronquiectasia ocorreu em 10 amostras (10/36; 27,8%), onde havia extensa necrose de brônquios, associada à hemorragia, grande quantidade de fibrina, grumos bacterianos e neutrófilos degenerados (E01.1, E01.2, E03.6, E03.7, E10.3, E18.1, E18.2, E18.3, amostras clínicas; e E20.1 e E25.1, de frigorífico), sem diferença estatística significativa entre amostras clínicas e oriundas de abate (**Tabela 3**) (**Figura 8B**).

Pleurite foi observada em 14 casos (14/36; 38,9%), caracterizada por infiltração inflamatória predominantemente linfocitária. Nove (9/36; 25%) apresentaram curso crônico, com marcante proliferação de fibroblastos (**Figura 8E**). Pleurite aguda ocorreu em cinco casos (5/36; 13,9%); em seis (6/36; 16,7%) havia exsudação de fibrina (**Figura 8D**); e hemorragia ocorreu somente em uma

amostra (1/36; 2,8%). Não houve diferença estatística para ocorrência de pleurite em amostras clínicas e oriundas de frigorífico (**Tabela 3**).

A avaliação de linfonodos demonstrou infiltração maciça de neutrófilos em doze amostras (12/29; 41,4%) das 29 avaliadas, caracterizando linfadenite neutrofílica aguda moderada a grave; e em quatro destas (4/29; 13,8%) havia hemorragia associada. Todas estas amostras apresentaram linfadenomegalia moderada a grave à avaliação macroscópica, e oito delas eram oriundas de granja. Em outras três (3/29; 10,3%) observou-se somente hemorragia subcapsular moderada a grave, todas oriundas de frigorífico. Não houve diferença estatística significativa entre amostras clínicas e oriundas de abate. Uma única amostra (E18.2, amostra clínica), demonstrou linfadenite fibrino-hemorrágica e neutrofílica aguda grave (**Figura 8F**). Nenhuma amostra apresentou depleção linfocitária e/ou infiltração histiocitária (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Alterações histopatológicas em amostras clínicas e de frigorífico.

Amostras	Bronquiectasia	Bronquite <sup>§</sup>	Hiperplasia de BALT <sup>¥</sup>	Pleurite	Linfadenite*
Clínicas (n=21)	8 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
Frigorífico (n=15)	2 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
Total (n=36)	10 (27,8%)	25 (69,4%)	19 (52,8%)	14 (38,9%)	12 (41,4%)*

Amostras com extensão de pneumonia superior a 34% (n=36). § Bronquite moderada a grave. ¥ Hiperplasia de tecido linfocitário broncoassociado leve a moderada; não houve hiperplasia acentuada. \*Avaliou-se somente 29 linfonodos mediastínicos. **a, b:** em colunas, números seguidos de letras distintas, diferem estatisticamente entre si ( $p<0,05$ ), entre amostras clínicas e de frigorífico.

#### 4.4 Imuno-histoquímica

No total geral de pulmões avaliados (n=44), 20 foram positivos para Influenza tipo A na IHQ (20/44; 45,5%). Vinte e três resultaram positivas para *M. hyopneumoniae* (23/44; 52,3%), sendo oito com marcação leve (+), dez com marcação moderada (++) e cinco com marcação intensa (+++). Doze amostras (12/44; 27,3%) apresentaram infecção mista de Influenza tipo A e *M. hyopneumoniae*. A IHQ de PCV2 revelou apenas uma amostra com marcação positiva (E21.1), porém esta

marcação foi notada apenas em dois histiócitos de linfonodo mediastínico, e não havia alterações histológicas sugestivas de infecção por PCV2 em pulmão e linfonodos. Portanto, esta amostra foi interpretada como negativa para circovirose, baseado na necessidade da associação de achados histológicos sugestivos e marcação antigênica moderada a grave (Souza et al., 2008). Esta única amostra que apresentou marcação para PCV2, foi positiva para Influenza tipo A (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Perfil de positividade para *Mycoplasma hyopneumoniae*, Influenza tipo A e Circovirus suíno tipo 2, detectadas pela imuno-histoquímica, nas 44 amostras de pulmão com isolamento prévio de *Pasteurella multocida*, provenientes de 28 rebanhos.

Agentes	Amostras	Rebanhos
Circovirus suíno tipo 2	0	0
Influenza tipo A somente	8	2
<i>M. hyopneumoniae</i> somente	11	6
Influenza A e <i>M. hyopneumoniae</i>	12	13

Amostras com extensão de pneumonia inferior a 34% foram excluídas da comparação entre amostras clínicas e de frigorífico. Amostras positivas para Influenza tipo A apresentaram bronquite linfocitoplasmocitária de moderada a grave (15/18; 83,3%); destas, cinco apresentaram também bronquiectasia (E03.7, E10.3, E18.1, E18.3, amostras clínicas; e E20.1, obtida em frigorífico).

Três amostras positivas, simultaneamente para *M. hyopneumoniae* e Influenza tipo A,

apresentaram bronquiectasia, sendo estas as mesmas acima citadas (E03.7, E18.1 e E20.1). Onze amostras com marcação positiva leve a moderada para *M. hyopneumoniae* apresentaram hiperplasia de BALT em grau leve a moderado; nenhuma amostra demonstrou hiperplasia acentuada de BALT. Todas as amostras com marcação intensa (+++) tiveram infecção mista de *M. hyopneumoniae* e Influenza tipo A (E12.1, E19.1, E20.1, E24.1, coletadas ao abate) (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Lesões histopatológicas relacionadas à infecções mistas de *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae*, ou *P. multocida* e Influenza tipo A, os três agentes ou somente *P. multocida*, em amostras clínicas e de abate<sup>£</sup>.

Imuno-histoquímica	Amostras	Hiperplasia de BALT <sup>¥</sup>	Bronquiectasia	Bronquite <sup>§</sup>
<b><i>M. hyopneumoniae</i></b>				
Amostras clínicas	5	3	1	3
Amostras de frigorífico	3	1	0	1
<b><i>M. hyopneumoniae</i> + Influenza A</b>				
Amostras clínicas	5	2	2	3
Amostras de frigorífico	5	5	1	4
<b>Influenza A</b>				
Amostras clínicas	6	2	2	6
Amostras de frigorífico	2	1	0	2
<b><i>Pasteurella multocida</i> somente</b>				
Amostras clínicas	5	1	3	3
Amostras de frigorífico	5	4	1	3

£ Não foram incluídas nesta tabela amostras com extensão de pneumonia inferior a 34% da área total do órgão (n=36). ¥ BALT: Tecido linfoide broncoassociado. § Bronquite e bronquiolite linfohistioplasmocitárias moderada a grave.

#### 4.5 *Pasteurella multocida* de alta patogenicidade

Treze amostras (13/44; 29,5%) apresentaram à bacteriologia cultivo puro de *P. multocida*, e resultados negativos na IHQ para os três agentes pesquisados. Destas, sete eram amostras clínicas (7/25; 28%), e seis oriundas de frigorífico (6/19; 31,5%). Com exceção da amostra E11.1, todas causaram pneumonia, com extensão de 23% a 80% de área pulmonar (**Tabela 6**). Cada amostra era oriunda de um rebanho diferente, e em seis rebanhos, pulmões de outros animais amostrados demonstraram positividade para outras doenças concomitantes através da IHQ. Assim, somente sete rebanhos demonstraram detecção isolada de *P. multocida*, no entanto foi avaliada amostra de apenas um animal de cada um destes rebanhos.

As amostras clínicas E01.1, E03.6, E11.1 e E18.2 demonstraram pleurite fibrinosa grave, e nenhuma amostra coletada em

frigorífico apresentou pleurite (**Tabela 6**). Pericardite foi observada em três amostras clínicas, sendo que a E03.6 havia exsudação de fibrina, e outras duas (E16.1, E18.2) apresentavam um curso mais avançado, evoluindo para cronicidade, com aderência ao epicárdio e sem exsudação de fibrina. Das amostras coletadas em frigorífico, somente uma demonstrou pericardite (E22.1) (**Tabela 6**), porém estava em curso subagudo, sem aderências, e de onde foi possível o isolamento de *P. multocida*.

A avaliação de linfonodos mediastínicos das amostras clínicas foi possível somente em seis casos, e nestas observou-se aumento de volume moderado a grave em três casos (E01.1, E03.6, E18.2), discreto em um caso (E11.1), e ausência de alterações em dois (E14.1 e E16.1) (**Tabela 6**). À microscopia, somente a amostra E18.2 apresentou alterações histológicas marcantes, com linfadenite fibrino-hemorrágica e neutrofílica moderada aguda (**Figura 8F**).

**Tabela 6:** Caracterização de amostras clínicas e coletadas em frigorífico, com diagnóstico de somente *Pasteurella multocida*.

Amostra	Idade	Extensão de pneumonia	Pleurite	Pericardite	Linfadenomegalia
<b>E01.1</b>	120 dias	75%	<b>Sim</b>		<b>Sim</b>
<b>E03.6</b>	120 dias	50%	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>
<b>E11.1</b>	154 dias	0%	<b>Sim</b>		
E14.1	110 dias	35%			
E15.3	120 dias	40%			NR
<b>E16.1</b>	90 dias	27%		<b>Sim</b>	
<b>E18.2</b>	149 dias	80%	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>
E04.4	Frigorífico	23%			NR
E05.1	Frigorífico	40%			NR
E07.1	Frigorífico	40%			NR
<b>E22.1</b>	Frigorífico	64%		<b>Sim</b>	
E23.1	Frigorífico	80%			<b>Sim</b>
E25.1	Frigorífico	60%			<b>Sim</b>

NR: não realizado.

De três amostras oriundas de frigorífico não foi possível coletar linfonodos, portanto somente três foram avaliadas, e destas, duas demonstraram aumento de volume moderado a acentuado (E23.1 e E25.1), e a amostra E22.1 não apresentou alteração (**Tabela 6**). À histologia, as amostras E22.1 e E25.1 apresentaram somente hemorragia subcapsular moderada; não houve infiltração inflamatória nas amostras avaliadas.

À avaliação histológica de pulmões, doze apresentaram broncopneumonia neutrofílica, exceto E05.1 (abate) que apresentou pneumonia broncointersticial. Doze amostras demonstraram curso agudo ou

subagudo, com presença de edema e fibrina em espaço alveolar. Somente a amostra clínica E01.1 apresentou curso crônico. Bronquite linfocitária de moderada a grave esteve presente em oito amostras, sendo quatro de amostras clínicas, e quatro de abate. Bronquiectasia ocorreu em quatro amostras, sendo três destas oriundas de casos clínicos (E01.1, E03.6, E18.2), e somente uma coletada ao abate (E25.1).

Não houve diferença estatística significativa para a ocorrência de alterações macroscópicas em amostras com diagnóstico de somente *P. multocida* e as outras com infecções concomitantes (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Alterações macroscópicas de amostras com diagnóstico de somente de *Pasteurella multocida*, e demais amostras com infecções concomitantes.

Amostras	Média de Extensão Pneumonia <sup>‡</sup>	Abscesso	Hemorragia	Pleurite	Pericardite	Líquido Cavitário
<b><i>P. multocida</i></b> <b>(n=13)</b>	51% <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Co-infecção</b> <b>(n=31)</b>	47% <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Total</b> <b>(n=44)</b>		10	5	15	10	2

<sup>‡</sup> Áreas de consolidação com distribuição cranioventral. Média da extensão de pneumonia, segundo Halbur et al. (1995). **a, b:** em colunas, números seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, para  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A *P. multocida* é um agente de grande importância dentro do PRDC, e diversos trabalhos brasileiros (Borowski, 2001; Morés, 2006; Borowski et al., 2007; Kich et al., 2007; Heres, 2009) e internacionais (Kim et al., 2003; Cappuccio et al., 2004; Pijoan, 2006; Hansen et al., 2010; Wellenberg et al., 2010; Pors et al., 2011) relatam seu envolvimento. Neste estudo, avaliou-se a participação desta em quadros de doença respiratória em suínos de terminação, onde se confirmou a existência de co-infecção deste agente com o vírus da Influenza tipo A e com *M. hyopneumoniae*, em rebanhos suínos de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso, mas não com o PCV2 (**Tabela 4**). Estudos brasileiros já relataram a participação da *P. multocida* em infecções respiratórias em Santa Catarina (Morés, 2006), e no Rio Grande do Sul (Borowski et al., 2002; Heres, 2009). No entanto, para as regiões sudeste e centro-oeste não foram localizados trabalhos científicos a respeito, encontrando-se somente relatos publicados em congressos que sugerem a importância da *P. multocida* para o quadro respiratório na região (Barbosa et al., 2009; Silva et al., 2009; Maciel et al., 2011). Apesar de não ser um estudo de caráter epidemiológico, com objetivo de determinar a prevalência desta enfermidade, foi possível observar a ocorrência desta bactéria em rebanhos localizados nas principais regiões produtoras de suínos no estado de Minas Gerais, como Zona da Mata, região metropolitana de Belo Horizonte, Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e Sul, segundo Garcia e Aguiar (2010).

Os resultados do presente trabalho revelam participação maciça do sorotipo A nos casos de pleuropneumonia avaliados, e somente quatro isolados eram sorotipo D, todos obtidos de pulmões coletados em frigoríficos. Estes dados estão de acordo com a literatura que relata maior

participação do sorotipo A, e que o sorotipo D pode estar envolvido, porém em menor frequência (Borowski, 2001; Davies et al., 2003; Pijoan, 2006; Borowski et al., 2007; Bethe et al., 2009; Boyce et al., 2010), e corroboram os dados de Heres (2009). No entanto, Morés (2006) encontrou maior frequência do sorotipo D em amostras obtidas de frigoríficos (27,3%), porém esta frequência foi muito semelhante à do envolvimento do sorotipo A (24%) nas amostras por ele avaliadas.

No presente estudo, não foi possível realizar a pesquisa do gene *tox4*, responsável pela codificação da toxina dermonecrótica. No entanto, sua importância em quadros de pleuropneumonia é discutível (Pijoan, 2006; Borowski et al., 2007; Boyce et al., 2010). Outros trabalhos relatam a ausência deste gene em amostras obtidas de quadros pulmonares (Borowski et al., 2002; Heres, 2009; Hansen et al., 2010; Costa et al., 2011), mas apesar disto, esta caracterização será feita posteriormente em todas as amostras, como continuação deste trabalho.

A caracterização bioquímica dos isolados demonstrou resultados como esperados para utilização de alguns substratos, no entanto não se comportou como esperado, de acordo com a literatura para outros (Holt et al., 1994). A fermentação de dulcitol e sorbitol identificaram a presença da subespécie *septica* em uma amostra, e *multocida* nas demais, segundo Quinn et al. (1994) e Davies (2004). Esta única amostra da subespécie *septica* (E29.3) pertence ao mesmo rebanho de outras duas amostras da subespécie *multocida* (E29.1 e E29.2). Esta maior ocorrência da subespécie *multocida* está de acordo com a literatura para quadros patológicos de suínos (Boyce et al., 2010), e corrobora outros estudos (Borowski, 2001; Davies et al., 2003; Heres, 2009). O isolado da amostra E05.1 (frigorífico) esteve fora do padrão para salicina, rafinose e esculina; a E23.1 (frigorífico) não esteve no padrão

esperado para salicina e rafinose. Em relação à maltose, espera-se que nenhuma cepa tenha a capacidade de fermentação, e neste caso 43 (97,7%) fermentaram, e somente uma esteve dentro do proposto (E29.2; amostra clínica). Somente um isolado não transformou nitrato em nitrito (E28.1; frigorífico). Este tipo de variação já foi relatado por Borowski et al. (2002) e Heres (2009), no entanto outros autores afirmam que este comportamento fenotípico da *P. multocida* não necessariamente representa grupos genotípicos distintos, e que esta classificação de subespécies proposta não revela relações filogenéticas, e tampouco engloba toda a diversidade genética da espécie (Davies, 2004; Boyce et al., 2010). Diversos pesquisadores já utilizaram técnicas moleculares para tentar estabelecer relação entre isolados de *P. multocida* obtidos de casos clínicos, no entanto não obtiveram resultados conclusivos que padronizassem a caracterização e propussem uma nova classificação (Borowski et al., 2002; Chen et al., 2002; Lainson et al., 2002; Davies et al., 2003; Bethe et al., 2009; Tang et al., 2009), e portanto pesquisas neste sentido devem ser realizadas a fim de detectar marcadores genéticos que melhor caracterizem este agente.

A caracterização de sensibilidade a antimicrobianos (**Figura 4**) revelou maior taxa de resistência à lincomicina, à qual não houve nenhum isolado sensível, assim como relataram Maciel et al. (2011) e Rebelatto et al. (2011). Este achado está de acordo com Songer e Post (2005) e Spinosa et al. (2006), que relatam indicação deste antimicrobiano para bactérias gram-positivas. Spinosa et al. (2006) sugere a possibilidade de haver resistência cruzada da lincomicina com macrolídeos, como o tilmicosin, e com a tiamulina, devido a propriedades em comum destas classes de antibióticos, fato este não observado neste trabalho, já que ambas demonstraram acima de 30 isolados

sensíveis a cada uma delas, dentre os 44 isolados avaliados (**Figura 4**). A tetraciclina também esteve entre as drogas com menor quantidade de isolados sensíveis, e está de acordo com Spinosa et al. (2006) que relatam redução da atividade terapêutica deste antimicrobiano ao longo dos anos, provavelmente devido à resistência adquirida por bactérias, e corrobora os achados de Heres (2009), no Rio Grande do Sul. A doxiciclina, droga da mesma classe, apresentou boa taxa de isolados sensíveis, assim como relata Maciel et al. (2011), em Minas Gerais.

O ceftiofur e a amoxicilina apresentaram boas taxas de sensibilidade (**Figura 4**), o que está de acordo com a literatura, que indica um espectro de ação voltado para bactérias gram-negativas (Songer e Post, 2005; Spinosa et al., 2006), assim como corrobora os achados de Borowski et al. (2002) e Heres (2009), ambos no Rio Grande do Sul, Rebelatto et al. (2011), em Santa Catarina, e Maciel et al. (2011), em Minas Gerais. A baixa taxa de sensibilidade da penicilina é esperada, já que tem melhor indicação para bactérias gram-positivas (Spinosa et al., 2006). Dentre as fluorquinolonas, a norfloxacin teve melhor desempenho, e a enrofloxacin e a ciprofloxacina apresentaram marcante taxa de resistência, fato este que corrobora os achados de Borowski et al. (2002), no Rio Grande do Sul, e contraria Silva et al. (2009), no Mato Grosso. A espectinomicina apresentou a segunda melhor taxa de sensibilidade frente aos 44 isolados, e este achado está de acordo com Maciel et al. (2011), em Minas Gerais, no entanto contraria os achados de Borowski et al. (2002), no Rio Grande do Sul.

Nota-se que o perfil de sensibilidade a antimicrobianos varia muito entre casos clínicos avaliados e regiões do Brasil. Ressalta-se a importância de determinar ao certo o perfil de sensibilidade às drogas

utilizadas em cada rebanho com a finalidade da indicação mais eficaz e uso racional de antimicrobianos a campo. O uso extensivo e inadequado a campo pode permitir a seleção de cepas resistentes às drogas utilizadas, assim como levar a um custo inapropriado com medicação ao indicar drogas que não apresentem o espectro de ação esperado para o agente envolvido no quadro, ou que para aquele rebanho já apresente resistência. Não foi possível localizar durante a realização deste trabalho, trabalhos que relatem mecanismos de resistência da *P. multocida*, e talvez esta seja uma indicação para realização futura.

A avaliação de sensibilidade de isolados obtidos de amostras clínicas comparativamente com amostras obtidas ao abate, somente demonstrou diferença significativa para a amoxicilina, com menor taxa de sensibilidade para isolados oriundos de casos clínicos. Uma tendência numérica também é observada para outras sete drogas (**Figura 5**). Este achado pode sugerir circulação de cepas mais resistentes envolvidas em casos clínicos, que levaram estes animais à enfermidade grave e mortalidade, ao contrário daqueles que chegaram à idade de abate, apesar da doença respiratória. Na mesma linha de pensamento, o perfil de sensibilidade de isolados obtidos de pulmão e extrapulmonares, comparativamente, foi diferente (**Figura 6**). Das quatro amostras avaliadas, duas demonstraram perfil de sensibilidade do isolado extrapulmonar menor em relação ao obtido do pulmão, apesar de existir diferença estatística somente para uma delas (E29.3). Estas amostras, além de apresentarem um quadro anatomopatológico mais grave, em relação ao que é citado na literatura a respeito da participação da *P. multocida* em quadros pneumônicos, os isolados obtidos das mesmas ainda demonstram maior taxa de resistência aos antimicrobianos, o que pode sugerir uma adaptação evolutiva destas bactérias. Mais estudos a este respeito

devem ser realizados, a fim de determinar se existe algum marcador genético nestes isolados, que justifique o comportamento dentro deste quadro.

A avaliação anatomopatológica das amostras revelou um tipo de lesão esperada, segundo a literatura (Pijoan, 2006; Caswell e Williams, 2007). Quarenta e três amostras (43/44) apresentaram pneumonia com áreas de consolidação de distribuição cranio-ventral, com secreção catarral em vias aéreas, no entanto para efeito de avaliação estatística e comparação entre casos clínicos e obtidos em frigorífico eliminou-se amostras de pulmão com área de pneumonia inferior a 34% de extensão. Assim, esta comparação demonstrou que as amostras clínicas apresentavam maior extensão de pneumonia, porém sem diferença estatística quando comparado às obtidas em frigorífico ( $p=0,0534$ ). Ainda, como esperado, observou-se abscessos e hemorragia nestas amostras, também sem diferença estatística entre amostras clínicas e oriundas de abate, porém houve diferença para a ocorrência de pleurite ( $p=0,0328$ ) e de linfadenomegalia moderada a grave em amostras clínicas ( $p=0,0185$ ) (**Tabela 2**).

Quinze amostras apresentaram pleurite (15/44; 34,1%), e nove destas tinham características de deposição de fibrina, assim como dez amostras apresentaram pericardite (10/44; 22,7%), sendo que duas delas apresentavam severa exsudação de fibrina, e outras seis já estavam em um curso mais avançado, apresentando aderências. Estes achados contrariam a literatura (Pijoan, 2006; Caswell e Williams, 2007), onde se diz que a *P. multocida* não seria capaz de levar a um quadro com marcante exsudação de fibrina em pleura e pericárdio, sendo estas lesões típicas de agentes tais como, *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis*, ausentes nas amostras aqui estudadas. No entanto, nossos achados corroboram o relato de Kich et al. (2007) e Hansen et al. (2010). Ainda,

na tentativa de eliminar amostras com pneumonia de pequena extensão, eliminaram-se oito amostras com quadro aparentemente menos grave, com extensão de pneumonia inferior a 34%. Com isso, eliminou-se uma amostra com quadro anatomopatológico diferenciado. A amostra E11.1, oriunda de um animal de 154 dias de idade, não apresentou pneumonia macroscopicamente, somente pleurite e peritonite fibrinosas, formação de abscessos a partir de pleura, pericárdio e tecidos adjacentes, e também havia acúmulo de um exsudato purulento livre na cavidade torácica. Neste caso, foi possível o isolamento puro de *P. multocida* tipo A dos locais de lesão, exceto na cavidade abdominal, assim como foi citado por Kich et al. (2007), na já referida inoculação experimental.

À avaliação histológica, encontraram-se alterações pulmonares dentro da expectativa para infecção por *P. multocida*, com broncopneumonia neutrofílica em 34 amostras, associada a alterações circulatórias marcantes, como edema e hemorragia. No entanto, havia marcante exsudação de fibrina em espaços alveolar, interlobulares e subpleurais, inclusive nas amostras com diagnóstico único de *P. multocida*, bem como pleurite fibrinosa em seis casos, lesões estas não descritas por Pijoan (2006) e Caswell e Williams (2007) no caso de infecção por este, ou mesmo por outros agentes, como *M. hyopneumoniae* ou Influenza tipo A. Ainda, nenhuma apresentou outras alterações histológicas sugestivas de infecção por *A. pleuropneumoniae* ou *A. suis*, apesar desta presença marcante de fibrina em diversas amostras (Caswell e Williams, 2007). Portanto, nossos resultados corroboram os achados de Kich et al. (2007) e Hansen et al. (2010), que sugerem a capacidade da *P. multocida* de causar exsudação de fibrina em pulmão e pleura.

Bronquiectasia foi observada em dez amostras (10/36; 27,8%). Três destas apresentaram infecção mista de *M. hyopneumoniae*, Influenza tipo A e *P. multocida*, e duas apresentavam infecção por Influenza tipo A associada à *P. multocida*. Pijoan (2006) e Caswell e Williams (2007) afirmam que este tipo de lesão é frequentemente observada quando existem infecções mistas, que levam a necrose de brônquios e bronquíolos. No entanto, quatro amostras negativas para PCV2, *M. hyopneumoniae* e Influenza tipo A, com diagnóstico único de *P. multocida* (E01.1, E03.6, E18.2, amostras clínicas; e E25.1, frigorífico) também apresentaram bronquiectasia, sugerindo que este agente isoladamente foi capaz de causar um quadro de tal gravidade. Bronquite e bronquiolite linfóhistioplasmocitárias foram observadas em todas as amostras com positividade para Influenza tipo A, como era de se esperar, considerando ser este o tipo de lesão inerente à infecção por este vírus (Caswell e Williams, 2007). No entanto, não foram observadas alterações em epitélios bronquial e bronquiolar, também esperadas, como hiperplasia epitelial e/ou necrose. Este fato pode ser explicado pelo estágio da infecção, em fase precoce ou adiantada, não sendo possível a detecção destas alterações.

A avaliação microscópica de linfonodos mediastínicos demonstrou que não houve infiltração histiocitária marcante e/ou depleção linfóide, lesões sugestivas de infecção por PCV2, portanto este achado é coerente com os resultados de negatividade à IHQ para este agente nas amostras avaliadas. Já infiltração neutrofílica foi observada em 41,4% das amostras avaliadas, e hemorragia em sete amostras, como era de se esperar em casos com infecção por *P. multocida* (Caswell e Williams, 2007). Um único caso (E18.2) apresentou linfadenite neutrofílica fibrino-hemorrágica grave, amostra que demonstrou positividade apenas para *P. multocida*, o que pode sugerir que

esta lesão e a presença da fibrina podem estar relacionados a este agente.

Na **tabela 7** nota-se que não existe diferença estatística significativa quanto à presença de lesões macroscópicas entre amostras com diagnóstico único de *P. multocida* e aquelas com infecções concomitantes, inclusive quanto à média de extensão de pneumonia observada. Porém, na **tabela 6**, nota-se que existe uma tendência numérica em relação à presença de pleurite, pericardite, líquidos cavitários e linfadenomegalia em amostras clínicas, com diagnóstico único de *P. multocida*; e que as amostras obtidas ao abate apresentaram quadro anatomopatológico de menor gravidade, já que não apresentaram as patologias supracitadas, com exceção à E22.1, que apresentou pericardite aguda. A *P. multocida* é considerada um microrganismo comensal no trato respiratório de suínos, e de baixa patogenicidade para o hospedeiro (Davies et al., 2003; Pijoan, 2006), portanto, neste caso, pode-se tentar correlacionar estes isolados de amostras de frigorífico à cepas oportunistas de *P. multocida*. Eventualmente, a saúde pulmonar destes animais ficou prejudicada não por agentes infecciosos primários, e sim por outros desafios ambientais e de manejo a que estes animais foram expostos, e este agente comensal pode ter causado um quadro patogênico (Honnold, 2009).

Os isolados obtidos de amostras clínicas estão envolvidos em um quadro geral de maior extensão e gravidade (**Tabela 6**). Nesta tabela, observa-se a ocorrência de pleurite e pericardite em amostras com isolamento único *P. multocida*. Em quatro casos observou-se pleuropneumonia fibrinosa, e em um destes (E03.6) havia pericardite fibrinosa associada. Nossos resultados demonstram que isoladamente, este agente foi capaz de causar lesões com marcante exsudação de fibrina em pleura, pericárdio, pulmão, e inclusive em um

linfonodo mediastínico (E18.2), assim como causar bronquiectasia em quatro amostras. Ainda, observou-se um caso de pleurite fibrinosa grave na ausência de pneumonia (E11.1). Contrariando aquilo que diz a literatura quanto ao tipo de lesão esperada pela infecção por este agente, estes achados podem sugerir o envolvimento de cepas de *P. multocida* de maior patogenicidade, que foram capazes de alterar o padrão de alterações anatomopatológicas encontradas quando havia o envolvimento desta.

No entanto, neste estudo não foi possível pesquisar marcadores de patogenicidade que poderiam determinar estas características. Todos os isolados de *P. multocida* foram do sorotipo A, exceto a E04.4, que é sorotipo D. Os isolados da E05.1 e E23.1, ambos de frigorífico, apresentaram um comportamento diferente do esperado em algumas provas de fermentação de açúcares, e nenhum dos isolados de amostras clínicas apresentou comportamento fora do esperado perante estas provas, exceto para a maltose; porém, não é possível inferir que estes sejam marcadores seguros para caracterizar estas cepas. Ainda, duas amostras (E06.3 e E22.1) que tiveram isolamento extrapulmonar, foram testadas quanto à sensibilidade a antimicrobianos (**Figura 6**), e, como citado anteriormente, foi possível observar um perfil variado entre elas e os isolados de pulmão do mesmo animal, já que o isolado extrapulmonar demonstrou maior taxa de resistência. Apesar de não haver significância estatística, este dado pode servir como mais um indício de que haja algum tipo de diferença inerente a cepas de alta patogenicidade que determinariam, por exemplo, maior lesão tissular e exsudação de fibrina, além de capacidade de disseminação sistêmica.

Técnicas moleculares serão de grande valia como método alternativo na caracterização e epidemiologia de amostras de *P. multocida* de casos clínicos, já que métodos

tradicionais não têm sido efetivos para tal. É necessário determinar corretamente fatores de virulência ainda desconhecidos, que levem a quadros clínicos de maior gravidade do que aqueles conhecidos tradicionalmente. Será necessário ainda para estabelecer relações clonais entre cepas obtidas de amostras de campo (Borowski et al., 2002; Boyce et al., 2010). Davies et al. (2003) afirmam que proteínas de membrana externa apresentam heterogeneidade entre cepas, e que este pode ser um bom marcador para determinar relações epidemiológicas entre elas, no entanto, pouco se sabe sobre estas proteínas, inclusive seu papel na patogenicidade do microrganismo. Ainda sugere fortemente que existam diferentes clones envolvidos em casos pulmonares ou de RAP, mas pouco se sabe a respeito.

Davies et al. (2003) sugerem duas teorias com relação a possível manifestação clínico-patológica de diferentes cepas de *P. multocida*. A primeira é que há uma pequena diversidade genética entre amostras de *P. multocida*, já que representam a microbiota normal do sistema respiratório de suínos, e que seriam capazes de causar quadro patogênico em animais predispostos. A outra, diz que amostras oriundas de animais doentes apresentariam menor diversidade genética, uma vez que um pequeno número de clones seria capaz de causar doença primária. Portanto, será necessário comparar amostras obtidas de animais saudáveis, ou seja, de cepas comensais, com as cepas isoladas de animais doentes, para então determinar a diversidade genética existente entre amostras. Se esta segunda teoria se confirmar, os mesmos autores afirmam que existe a possibilidade de a *P. multocida* se comportar como um agente primário.

Nas amostras avaliadas neste estudo, não houve positividade para PCV2 à IHQ. Este achado pode estar vinculado à utilização maciça de vacinação nos rebanhos suínos da região, porém seria necessário um estudo de

prevalência mais abrangente para avaliar a verdadeira situação desta enfermidade nas regiões sudeste e centro-oeste. Por outro lado, nota-se a presença ainda marcante do *M. hyopneumoniae*, como é relatado na literatura (Kich et al., 2010), assim como a ascensão da Influenza tipo A (Schaefer et al., 2011). Das amostras avaliadas neste estudo, 20 foram positivas para Influenza tipo A, e oito destas apresentavam infecção concomitante com *M. hyopneumoniae*, além da *P. multocida*, o que reforça o conceito de síndrome multifatorial (Pijoan, 2006; Honnold, 2009; Kich et al., 2010; Hansen et al., 2010; Schaefer et al., 2011).

Neste trabalho, avaliou-se a participação da *P. multocida* em quadros respiratórios de suínos de terminação, e comparou-se amostras obtidas de animais ao abate e de casos clínicos de granjas, onde foi possível notar uma tendência geral para maior gravidade em amostras oriundas de casos clínicos, com pleuropneumonia fibrinosa e pericardite. Estes animais foram selecionados, baseando-se em sinais clínicos evidentes, e que na maioria dos casos, levaram estes suínos ao óbito antes que chegassem ao abate, caracterizando um grau acentuado da doença. Em algumas amostras, foi possível detectar o envolvimento apenas da *P. multocida*, que sugere a sua participação direta nos quadros e na mortalidade animais terminados. Estudos mais amplos e mais aprofundados são necessários e estão sendo conduzidos, com o intuito de definir a real importância deste agente nestes quadros de doenças respiratórias em suínos de terminação. É de grande importância determinar possíveis marcadores que justifiquem estes quadros de maior patogenicidade encontrados em amostras de campo com envolvimento único de *P. multocida*.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a participação da *P. multocida* em quadros respiratórios de suínos de terminação, e demonstrou a ocorrência de casos de pleuropneumonia fibrinosa com envolvimento único deste agente, o que indica sua participação primária dentro do quadro. Amostras clínicas, quando comparadas a amostras obtidas de frigorífico, demonstraram quadro anatomopatológico mais grave, o que sugere envolvimento de cepas de maior patogenicidade em casos clínicos. Estudos mais amplos e aprofundados são necessários para determinar possíveis marcadores envolvidos nestes quadros de maior gravidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, T.R.; COSTA, A.T.R.; REIS, R. Frequência das infecções bacterianas associadas à circovirose suína clínica. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 14, 2009, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte, MG: ABRAVES-MG, 2009. p. 319-320.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BETHE, A.; WIELER, L.H.; SELBITZ, H.; et al. C. Genetic diversity of porcine *P. multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Vet. Mic.*, v. 139, p. 97-105, 2009.
- BOROWSKI, S.M. Pasteurelose pulmonar: uma atualização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre, RS. *Anais...* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001. p. 90-95.
- BOROWSKI, S.M.; IKUTA, N.; LUNGE, V.; et al. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. *Pesqui. Vet. Bras.* v.22, n.3, p.97-103, 2002.
- BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds). *Doença dos suínos*. Goiânia: Cânone Editorial. 2007. p.177-181.
- BOYCE, J.D.; HARPER, M.; WILKIE, I.W.; et al. *Pasteurella* In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; et al. *Pathogenesis of bacterial Infections in Animals*. 4.ed. Ames: Blackwell Publishing. 2010. p.325-346.
- BRENTANO, L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; et al. Levantamento Soroepidemiológico para Coronavírus Respiratório e da Gastroenterite Transmissível e dos Vírus de Influenza H3N2 E H1N1 em Rebanhos Suínos no Brasil. *Comunicado técnico*, n.306, 6p., 2002. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/cot306.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot306.pdf)>. Acesso em:01jan.2012.
- CAPPUCCIO, J.; LEOTTA, G.A.; VIGO, G.; et al. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs with broncho and pleuropneumonia. In: 18 CONGRESS OF INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 18, 2004, Hamburgo. *Proceedings...* 2004. p. 205.
- CARTER, G.R.; RUNDELL, S.W. Identification of type A strains of *P. multocida* using Staphylococcal hyaluronidase. *Vet. Rec.*, v. 96, n. 15, p. 343, 1975.

- CARTER, G.R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am. J. Vet. Res.*, v. 34, n. 2, p. 293-294, 1973.
- CASTRO, L.A. O seqüenciamento do genoma de *Mycoplasma hyopneumoniae* e sua repercussão na suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, supl. 1, p. 101-105, 2008.
- CASWELL, J.L.; WILLIAMS, K.J. Respiratory system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.C. (Eds). *Pathology of domestic animals*. 5.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. p.523-653.
- CHEN, H.I.; HULTEN, K.; CLARRIDGE III, J.E. Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.9, p. 3438-3441, 2002.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SIMON, N. L.; et al. Identificação do Circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imuno-histoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Cien. Rur.*, v. 36, n. 5, p. 1480-1485, 2006.
- COSTA, A.T.R.; REIS, R.; FERREIRA, H.B.C.; et al. Isolamento de *Mycoplasma hyopneumoniae* de pulmões no Brasil. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 14, 2009, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte, MG: ABRAVES-MG, 2009. p. 399-400.
- COSTA, A.T.R.; REIS, R.; MORENO, A.; et al. Caracterização de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de casos clínicos em suínos In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 15, 2011, Fortaleza, CE. *Anais...* Fortaleza: ABRAVES-CE, 2011.
- DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; BAILLIE, S.; et al. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.*, v.52, p. 59-67, 2003.
- DAVIES, R.L. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiol.*, v.150, p.4199-4210, 2004.
- FABLET, C.; MAROIS, C.; DORENLOR, V.; et al. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res. Vet. Sci.* (2011), <doi:10.1016/j.rvsc.2011.11.002>.
- GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; GOYACHE, J.; et al. Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain. *Vet. Rec.*, v. 169, n.14, p.362, 2011.
- GARCIA, S.K.; AGUIAR, M.R. Suinocultura em Minas Gerais – 2010. 2010. Disponível em: < <http://www.asemg.com.br/novo/wp-content/uploads/2011/11/SUINOCULTURA-MINEIRA-2010-UFMG-IMA-ASEMG-Resumo-novembro2011.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- HAINES, D. M.; WATERS, E. H.; CLARK, E. G. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can. J. Vet. Res.*, v. 57, n. 1, p. 33-36, 1993.
- HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; FREY, M.L.; et al. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the

- Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, v.32, p.648-660, 1995.
- HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E.; et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J. Comp. Path.*, v.143, n.2-3, p.120-131, 2010.
- HERES, T.S. Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com Circovirose em suínos. 2009. 64f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- HOLT, J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787 p.
- HONNOLD, C. *Porcine respiratory disease complex*. Ergomix, 2009. Disponível em <<http://en.engormix.com/MA-pig-industry/health/articles/porcine-respiratory-disease-complex-t1378/165-p0.htm>>. Acesso em 10jan.2012.
- KICH, J.D.; MORÉS, N.; TRIQUES, N.J.; et al. A *P. multocida* tipo A atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? *Comunicado Técnico*, n.469, 7p., 2007. Disponível em: <[www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_x8g42b6i.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_x8g42b6i.pdf)>. Acesso em: 01jan.2012.
- KICH, J.D.; KUCHISHI, S.S.; MORÉS, M.A.Z.; et al. Agentes bacterianos de pneumonia associados a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: SINSUI – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA – PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 5, 2010, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS, 2010. p.17-25.
- KIM, J.; CHUNG, K.; CHAE, C. Association of porcine Circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.*, v. 166, p. 251-256, 2003.
- LAINSON, F.A., AITCHISON, K.D.; DONACHIE, W.; et al. Typing of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.2, p. 588-593, 2002.
- LUNA, L. G. Routine staining procedures. In: LUNA, L. G. (Ed). *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. New York: McGraw-Hill Book Co, 1968. p. 24-58.
- MACIEL, B.A.G.; BRANDÃO, A.R.; MOREIRA, V.G.; et al. Avaliação da sensibilidade de agentes bacterianos frente a antimicrobianos em suínos com infecções respiratórias. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 15, 2011, Fortaleza, CE. *Anais...* Fortaleza, CE: ABRAVES-CE, 2011.
- MANCINI, D. A. P.; CUNHA, E. M. S.; MENDONÇA, R. M. Z. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. *Virus Rev. Res.*, v. 11, p. 39-43, 2006.
- MORÉS, M.A.Z. Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças de suínos nos matadouros. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- MORÉS, N. Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico e controle da pasteurelose pneumônica em suínos. *Projeto aprovado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

- (EMBRAPA). Concórdia: Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, 2011. 39p.
- MORÉS, N.; BARCELLOS, D.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Circovirose suína. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds.) *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.213-225.
- PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE; et al. (Eds.) *Diseases of swine*. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 719-726.
- PORS, S.E.; HANSEN, M.S.; BISGAARD, M.; et al. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. *Vet. Mic*, v.150, n.1-2, p.160-166, 2011.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; et al. (Eds) *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe Publishing, 1994. 648p.
- REBELATTO, R.; KLEIN, C.S.; BELLAVER, F.V.; et al. Isolados bacterianos provenientes de granjas de suínos e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 15, 2011, Fortaleza, CE. *Anais...* Fortaleza, CE: ABRAVES-CE, 2011.
- SCHAEFER, R.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; BRENTANO, L.; et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pig in Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.31, n.9, p.761-767, 2011.
- SILVA, A.F.; SILVA, M.; ACOSTA, J.C.B.; et al. Avaliação do comprometimento pulmonar em suínos das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil pelo emprego do programa de gerenciamento da saúde respiratória em suínos (PEC) de 2002 a 2006. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006, Foz do Iguaçu, PR. *Anais...* São Paulo: Editora Animalworld, 2006. p.429-432.
- SILVA, G.R.F.; SILVA, M.C.; DIAS, D.F.; et al. Surto de pneumonia por *Pasteurella multocida* em suínos no estado do Mato Grosso. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 14, 2009, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte, MG: ABRAVES-MG, 2009. p. 407-408.
- SOBESTIANSKY, J; PIFFER, I.A.; FREITAS, A.R. Impacto de doenças respiratórias dos suínos nos sistemas de produção do estado de Santa Catarina. *Comunicado Técnico*, n.123, 6p., 1987. Disponível em: <[www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/cot123.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot123.pdf)>. Acesso em: 01jan.2012.
- SOBESTIANSKY, J.; COSTA, O.A.D.; MORÉS, N.; et al. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná. *Comunicado Técnico*, n.287, 6p., 2001. Disponível em: <[www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/cot287.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot287.pdf)>. Acesso em: 01jan.2012.
- SOBESTIANSKY, J.; RISTOW, L.E.; MATOS, M.P.C.; et al. Micoplasmoses – Pneumonia enzoótica. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds). *Doença dos suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.159-169.
- SONGER, J.G.; POST, K.W. *Veterinary Microbiology – Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. St. Louis: Elsevier Saunders Publishing, 2005. 424p.
- SOUZA, N.N.; LOBATO, Z.I.P.; GUEDES, R.M.C. Estudo retrospectivo de diagnósticos de circovirose suína pela técnica de

imunoistoquímica. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, p. 521-525, 2008.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.;  
BERNARDI, M.M. (Eds.) *Farmacologia  
aplicada à medicina veterinária*, 4.ed. Rio  
de Janeiro: Ganabara Koogan, 2006. 897p.

TANG, X.; ZHAO, Z.; HU, J.; et al.  
Isolation, antimicrobial resistance and  
virulence genes of *Pasteurella multocida*  
strains from swine in China. *J. Clin.  
Microbiol.*, v.47, n.4, p.951-958, 2009.

TOWNSEND, K.M.; BOYCE, J.D.;  
CHUNG, J.Y.; et al. Genetic organization of  
*Pasteurella multocida* cap loci and  
development of a multiplex capsular PCR

typing system. *J.Clin. Microbiol.*, v.39,  
p.924-929, 2001.

VINCENT, L. L.; JANKE, B. H.; PAUL, P.  
S.; et al. A monoclonal-antibody-based  
immunohistochemical method for the  
detection of swine influenza virus in  
formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p.191-195, 1997.

WELLENBERG, G.J.; BOUWKAMP, F.T.;  
WOLF, P.J.V.D.; et al. A study on the  
severity and relevance of porcine Circovirus  
type 2 infections in Dutch fattening pigs  
with respiratory diseases. *Vet.Microbiol.*,  
v.142, n.3-4, p.217-224, 2010.

1

## ANEXO I

<b>Brônquios</b>				
Exsudato lúmen				
Infiltrado peribronquial				
Infiltrado periglandular				
Infiltração Lam. própria				
Hiperplasia epitelial				
Deg/Necrose epitelial				
Bronquiectasia				
<b>Bronquíolo</b>				
Exsudato lúmen				
Hiperplasia epitelial				
Deg/Necrose epitelial				
Fibrina lúmen				
Infil. peribronquiolar				
<b>BALT</b>				
Brônquios				
Bronquíolos				
<b>Alvéolos</b>				
Infiltração Septo				
Hiperplasia PNM tipo II				
Exsudato no lúmen				
Fibrina				
Edema				
Necrose				
Hemorragia				
Fibroplasia				
Infiltração perivascular				
<b>Espaços interlobulares</b>				
Edema				
Fibrina				
Fibroplasia				
Infiltrado inflamatório				
<b>Pleura</b>				
Fibrina				
Células inflamatórias				
Fibroplasia				
<b>Linfonodos</b>				
Depleção				
Infiltração Inflamatória				
Cél. Multinucleadas				
<b>Traquéia</b>				
Infiltrado Inflamatório				
Necrose de Epitélio				
Perda Ciliar				
Exsudato lúmen				
Infiltrado periglandular				

pØ: plasmócitos; lØ: linfócitos; nØ: neutrófilos; hØ: histiócitos  
0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso

## ANEXO II

**Protocolo – IMUNOHISTOQUÍMICA**  
***Influenza tipo A e Circovírus suíno tipo 2***

1. Xilol – 3 minutos

2. Xilol – 3 minutos
3. Xilol – 3 minutos
4. Xilol – 3 minutos
5. Álcool 100% - 3 minutos
6. Álcool 90% - 3 minutos
7. Álcool 80% - 3 minutos
8. Álcool 70% - 3 minutos
9. Água destilada – 3 minutos
10. PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sol. 3%)- 30 minutos (PBS 242,5 mL + 7,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 250 mL)
11. PBS – 30 minutos
12. Proteinase K 0,05% - 37°C – Câmara úmida – 5 minutos
13. PBS – 5 minutos
14. Leite em pó Mólico (20mL PBS + 0,5g leite) - 37°C – Câmara úmida – 45 minutos
15. Anticorpo Primário - 37°C – Câmara úmida – 45 minutos  
*Influenza* – 1:1000 (1mL Anticorpo : 999mL PBS = 1000mL) ou (5µL : 5mL)  
*Circovirus* – 1:800 (10µL Anticorpo : 8mL PBS)
16. PBS – 5 minutos
17. Anticorpo Biotinilado – T° ambiente – câmara úmida – 30 minutos
18. PBS – 5 minutos
19. Streptavidina – T° ambiente – câmara úmida – 25 minutos
20. PBS – 5 minutos
21. AEC – T° ambiente – câmara úmida – 10 minutos (\*utilizar luvas)
22. Água destilada – 5 minutos
23. Água de torneira – 5 minutos
24. Hematoxilina – até 1m30seg (dependendo se estiver nova ou muito usada)
25. Água de torneira corrente – até descorar o excesso
26. Lamínula – utilizar meio de montagem aquoso<sup>15</sup>

---

<sup>15</sup> Dako® - Faramount Aqueous Mounting Medium