

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**PLEURISIA NA SUINOCULTURA BRASILEIRA: AVALIAÇÃO DA
PREVALÊNCIA NO PAIS E ESTUDO DA *Pasteurella multocida* COMO
AGENTE CAUSADOR.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Enio Rivelino Maria Nascimento

Passo Fundo, RS, Brasil

2016

**PLEURISIA NA SUINOCULTURA BRASILEIRA: AVALIAÇÃO DA
INCIDÊNCIA NO PAIS E ESTUDO DA *Pasteurella multocida* COMO
AGENTE CAUSADOR.**

Enio Rivelino Maria Nascimento

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação. Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**.

Orientador: Prof. Eraldo Zanella

Passo Fundo, RS, Brasil

2016

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO

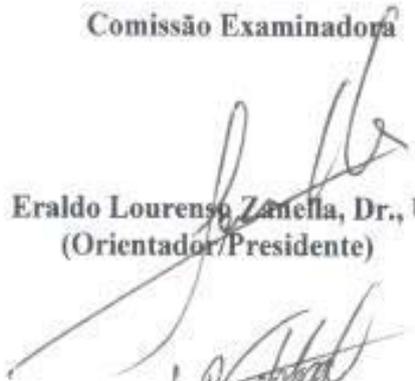
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

PLEURISIA NA SUINOCULTURA BRASILEIRA: AVALIAÇÃO DA
PREVALÊNCIA NO PAÍS E ESTUDO DA *Pasteurella multocida* COMO AGENTE
CAUSADOR

Elaborada por
Enio Rivelino Maria Nascimento

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

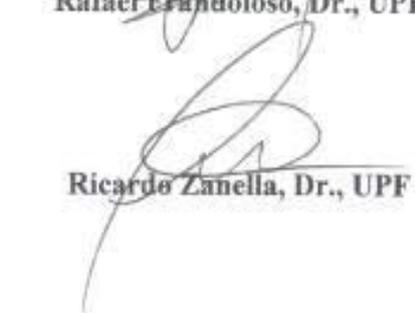
Comissão Examinadora



Eraldo Lourenço Zanella, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)



Rafael Brandoloso, Dr., UPF



Ricardo Zanella, Dr., UPF

Passo Fundo, RS, Brasil
2016

CIP – Catalogação na Publicação

N244p Nascimento, Enio Rivelino Maria

Pleurisia na suinocultura brasileira: avaliação da prevalência no país e estudo da *Pasteurella multocida* como agente causador / Enio Rivelino Maria Nascimento. – 2016.

59 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Zanella.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2016

1. Suíno - Criação - Brasil. 2. Pleurisia. 3. Pulmões - Doenças. I. Zanella, Eraldo, orientador. II. Título.

CDU: 636.4

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por minha saúde e força, à persistir no caminho, em todas as dificuldades e continuar nesta jornada de mudanças e de novos desafios, mas também de momentos felizes e de grande decisão.

À minha família, para minha esposa/companheira Liamara Nascimento que sempre me ajudou, incentivando e auxiliando e que com carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa. A minha filha Julia, que ficava esperando em casa para conversarmos ou para ver os temas de aula. Ao meu filho Diego, meu companheiro de jornada de estudos, pelo apoio na elaboração e revisão dos trabalhos.

À meu pai Orlando Nascimento e minha mãe Enia Nascimento, que sempre me incentivaram na carreira profissional, e que mesmo à distância, estavam ao meu lado e que sempre me deram força, na qual fora muito importante.

Agradecer ao meu orientador Professor Eraldo Zanella, pelo apoio, amizade e orientação que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos professores Luiz Carlos Kreutz, Ricardo Zanella e Rafael Frandoloso, pelo companheirismo, instrução e amizade.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da UPF, pelas palavras de incentivo, conhecimentos repassados que contribuíram para minha formação.

Aos amigos e colegas que convivi neste período de 2 anos de aprendizado, incentivo e coleguismo na PPBio. Aos colaboradores do laboratório, funcionários e voluntários da UPF, que tanto ajudaram na execução deste trabalho.

Aos amigos Leandro Marzari, Rosali Ebertz e Laurinda Mara Ribeiro, minha gratidão pelo companheirismo, dedicação, auxílio e informações técnicas.

Desejo apresentar meu carinhoso agradecimento à Equipe da Microvet, na pessoa do Prof. José Lúcio Santos e D. Maria, com quem tive o convívio durante nove anos e que tenho muito apreço e inspiração de família, ética e persistência. Ao Dr. Lucas que muito me auxiliou neste trabalho, bem como ao Daniel e ao Vitor.

A equipe da Empresa Mano Julio, na pessoa do Sr. Paulo Franz, que neste último ano me acolheram, apoiaram e incentivaram na conclusão deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, desde o incentivo inicial até a conclusão deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que me apoiou e incentivou para esta conquista. Ela é nossa!!!

EPÍGRAFE

“Tenha coragem de seguir o que seu coração e sua intuição dizem. Eles já sabem o que você realmente deseja. Todo resto é secundário”.

Steve Jobs

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 SUINOCULTURA NO BRASIL	18
2.2 PLEURA.....	19
2.3 PLEURISIAS	19
2.4 <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	21
2.4.1 Características da <i>P. multocida</i>	21
2.4.2 Fatores de Virulência	22
2.5 ANTIMICROBIANOS.....	26
3. CAPÍTULO 1 - Identificação e distribuição dos agentes causadores de pleurisia na suinocultura brasileira.	28
Resumo	29
Abstract.....	30
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Resultados e Discussão.....	34
Conclusões.....	40
Referências	41
RESUMO	43
4. CAPÍTULO - Avaliação da diversidade genética e resistência de <i>Pasteurella multocida</i> isolados em pleurisias de suínos no Brasil.	43
AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA DE <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i> ISOLADOS EM PLEURISIAS DE SUÍNOS NO BRASIL	44
Introdução.....	44

Material e Métodos	45
Resultados e Discussão.....	46
Conclusão	40
Referências Bibliográficas.....	48
5. CONCLUSÕES.....	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
7. BIBLIOGRAFIA	56

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Pleurisia em suíno com 60 dias de alojamento (A) Lesão de aderência da pleura, pericardite; (B) Fase aguda da pleurisia um exsudato fibrinoso é visível em superfícies pleurais. Fonte: Nascimento, E. R. M. (2015)..... 20

3. CAPÍTULO 1

Figura 2. Prevalência dos agentes causadores de pleurisia no Brasil, HPS; *P. multocida*; APP; *S. suis* e BB. UPF/RS 2016, 35

4. CAPÍTULO 2

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. Produto da amplificação do DNA de *P. multocida* A. Canaletas “M” do marcador lambda leader 1kb, nas 1, 2 e 3 são de Santa Catarina; 4, 5 e 6 de Minas Gerais; 7, 8 e 9 do Rio Grande do Sul; 10, 11 e 12 do Paraná; 13, 14 e 15 dos estados de São Paulo e Espírito Santo; 16, 17 e 18 dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. 49

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. Produto da amplificação do DNA de *P. multocida* D. Canaletas “M” do marcador lambda leader 1kb, nas 19, 20 e 21 são de Santa Catarina; 22, 23 e 24 de Minas Gerais; 25, 26 e 27 do Rio Grande do Sul; 28, 29 e 30 do Paraná; 31, 32 e 33 dos estados de São Paulo e Espírito Santo; 34, 35 e 36 dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. 50

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

Tabela 1. Ocorrência de Pleurisia por Estados no Brasil. UPF/RS, 2016.	34
Tabela 2. Teste de Fisher Exact para prevalência dos agentes causadores de pleurisia por localização geográfica nos estados do Brasil: HPS; <i>P. multocida</i> ; APP; <i>S. suis</i> e BB. Passo Fundo, UPF,2016.....	36
Tabela 3. Comparação dos grupos quanto á prevalência dos agentes bacteriano por fase de desenvolvimento estado e/ou região brasileira: HPS; <i>P. multocida</i> ; APP; <i>S. suis</i> e BB. Passo Fundo, UPF,2016.....	39

4. CAPÍTULO 2

Tabela 4. Dados referentes à investigação epidemiológica para pesquisa de <i>P. multocida A</i> em diferentes Estados - Brasil, 2013/2014.	49
Tabela 5. Dados referentes à investigação epidemiológica para pesquisa de <i>P. multocida D</i> em diferentes Estados - Brasil, 2013/2014.	50
Tabela 6. Tabela de frequência da sensibilidade antimicrobiana de 36 amostras de <i>P. multocida</i>	51
Tabela 7. Frequência da sensibilidade antimicrobiana de <i>P. multocida A</i> por perfil, A ¹ - Amoxicilina; A ² - Ampicilina; C ³ - Ciprofloxacina; E ⁴ - Enrofloxacina; F ⁵ - Florfenicol; N ⁶ - Norfloxacina; P ⁷ - Penicilina; T ⁸ - Tetraciclina; T ⁹ – Tilmicosina.....	52
Tabela 8. Frequência da sensibilidade antimicrobiana de <i>P. multocida D</i> por perfil, A ¹ - Amoxicilina; A ² - Ampicilina; C ³ - Ciprofloxacina; E ⁴ - Enrofloxacina; F ⁵ - Florfenicol; N ⁶ - Norfloxacina; P ⁷ - Penicilina; T ⁸ - Tetraciclina; T ⁹ – Tilmicosina.....	53

LISTA DE ABREVIATURA

HPS	<i>Haemophilus parasuis</i>
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
BB	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
DIF	Departamento de Inspeção Federal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
PR	Paraná
MG	Minas Gerais
C-OES	Centro Oeste (MS, MT e GO)
SUD	Sudeste (SP, RJ, ES)
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
GO	Goiás
SP	São Paulo
RJ	Rio de Janeiro
ES	Espirito Santo
CO ²	Dióxido de Carbono
°C	Graus Celsius

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**Pleurisia na suinocultura brasileira: Avaliação da prevalência no País
e estudo da *Pasteurella multocida* como agente causador.**

Autor: Enio Nascimento

Orientador: Eraldo Zanella

Passo Fundo, 02 de agosto de 2016

Pleurisia é uma lesão crônica, originada de um processo inflamatório da pleura parietal e visceral, sendo importante na suinocultura devido as perdas no desempenho dos animais e em carcaças nos abatedouros. Entre os agentes causadores, a *Pasteurella multocida* - *P. multocida*, o *Haemophilus parasuis* – HPS, *Actinobacillus pleuropneumoniae* – APP, *Streptococcus suis* – *S.suis* e a *Bordetella bronchiseptica* - BB estão entre os principais. Avaliar a fase de incidência e estudar a prevalência no Brasil é importante pois a partir destes estudos pode-se formular medidas de controle através de programas vacinais e medicamentosos adequados, reduzindo assim os custos e condenações no abate. A identificação dos agentes causadores das pleurisias, bem como a prevalência por fase e região do país, além da avaliação das diferenças entre cepas *P. multocida* foram os objetivos deste trabalho. Utilizou-se a *P. multocida* devido a prevalência e porque as lesões persistem até o abate acarretando maiores perdas econômicas. Primeiramente, foram classificados 420 exames com incidência de pleurisia em suínos de um laboratório de microbiologia entre 2013 e 2014, em que se obteve 55% de HPS, 31% de *P. multocida*, 7% de APP, 6% de *S. suis*, e 1% de BB. Quanto à idade, observou-se que a predominância do HPS foi na fase de creche entre os 30 aos 70 dias, que a *P. multocida* foi na fase de crescimento dos 80 aos 120 dias, enquanto a APP foi o agente mais encontrado em terminação dos 130 aos 180 dias. O *S.suis* e a BB apresentaram-se com pouca casuística. Quanto à prevalência por estado, o HPS é mais evidente nas regiões do sul do Brasil onde predominam temperaturas mais baixas. Já

em regiões de clima mais quentes, houve uma similaridade entre os isolados de *P. multocida* e HPS. Dos isolados de *P. multocida*, foram selecionados 36 amostras de forma aleatório, sendo 6 por estado do país. Realizou-se a extração do DNA com posterior reação da PCR para verificar a diversidade entre as amostras. Das amostras selecionadas de *P. multocida* A e *P. multocida* D, para SC e do Centro-Oeste (MS, MT e GO) verificamos similaridade entre os padrões de bandas indicando uma proximidade entre amostras, mas para as selecionadas de MG, RS, PR e dos estados do Sudeste (SP e ES) verificamos uma diversidade no número e distribuição de bandas, com diferentes migrações sugerindo uma diversidade acentuada, ou seja, há diferentes padrões de cepas da *P. multocida* no território brasileiro, sugerindo a necessidade de uma proteção específica por granja ou uma proteção cruzada que confira uma imunidade protetora homóloga contra todos os sorotipos de *P. multocida*. Com relação a antibiograma, verificou-se uma considerável resistência em alguns perfis genéticos principalmente originários de locais com alta concentração de animais, indicando que em criações intensivas deva-se ter cuidado com o uso indiscriminado de antibióticos.

Palavras-chave: Pleurisia, *P. multocida*, suínos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

Pleurisy in Brazilian pig farming: prevalence evaluation in the country and study of *Pasteurella multocida* as causative agent.

Author: Enio Nascimento

Advisor: Eraldo Zanella

Passo Fundo, August 02nd, 2016

Pleurisy is a chronic injury, originated from an inflammation of the parietal and visceral pleura, being important in pig farming due to the loss of performance of animals and carcasses in slaughterhouses. *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* and *Bordetella bronchiseptica* are the most important causative agents. To evaluate the incidence of stage and to study the prevalence in Brazil is important because from these studies can be formulated control programs vaccine and drug more appropriately, reducing costs and condemnations at slaughter. The identification of the causative agents of pleurisy, and the prevalence by phase and region of the country, besides the evaluation of the differences between *P. multocida* strains were the objectives of this work. Was used the *P. multocida* due to the prevalence and because lesions persist until slaughter resulting in greater economic losses. First, 420 exams with pleurisy in pigs were classified in a microbiology laboratory between 2013 and 2014, with 55% of HPS, 31% of *P. multocida*, 7% APP 7 %; 6% *S. suis* and 1% BB. Regarding age, it was observed that the prevalence of HPS was in the nursery phase between 30 to 70 days, the *P. multocida* was in the growth phase of 80 to 120 days, while the APP was the most frequent agent in termination from 130 to 180 days. The *S.suis* BB and presented with low series. HPS is more evident in the southern of Brazil, where prevails lower temperatures. In warmer climates, a similarity between the isolates of *P. multocida* and HPS was observed. Among the isolates of *P. multocida*, 36 samples in random order were selected, 6 per state in the country. DNA extraction was performed with subsequent reaction of PCR to verify the diversity among the

samples. Of selected samples of *P. multocida* A and *P. multocida* D to SC and the Midwest (MS, MT and GO) we find similarity between the band patterns indicating proximity between samples, but to the selected MG, RS, PR and Southeastern states (SP and ES) observed a diversity in the number and distribution of bands with different migration suggesting a marked diversity, there are different patterns of strains of *P. multocida* in Brazil, suggesting the need for a specific protection for farm or cross-protection conferring a homologous protective immunity against all serotypes of *P. multocida*. Regarding antibiograma, there was considerable resistance in some genetic profiles mainly originate in places with high concentration of animals, indicating that in intensive farming must be careful with the indiscriminate use of antibiotics.

Keywords: pleurisy, *P. multocida*, pigs.

1. INTRODUÇÃO

A principal fonte de proteína animal do mundo desde 1978 é a carne suína, atualmente representa 40,41% do consumo mundial de proteína animal, seguido pelo consumo de frango com 30,37 % e bovina com 21,66% (1). O Brasil é o 4º maior produtor e exportador de carne suína do mundo com uma exportação anual de 670 mil toneladas e produção de 3,6 milhões de toneladas (2). Entre os estados brasileiros produtores destacam-se o estado de Santa Catarina com a maior produção 26,68%, seguido do Rio Grande do Sul com 22,13%, Paraná 20,04%, Minas Gerais 11,45%, região Centro-Oeste (MS, MT e GO) e a região Sudeste (SP, RJ, ES e BA) com 5,4% (3).

Nas duas últimas décadas a suinocultura brasileira vem obtendo grandes avanços, graças as novas técnicas de produção como: manejo, nutrição, instalações, sanidade, melhoramento genético e aumento na concentração de animais. Tais avanços permitiram alavancar os resultados com ganho de peso, precocidade, qualidade da carcaça, bem estar animal dentre outros. Entretanto com o aumento na concentração de suínos, advêm o detrimento na área sanitária, facilitando a disseminação de doenças respiratórias que podem afetar o rebanho.

Neste sentido, o crescimento da incidência das patologias respiratórias, incidem em aumento de lesões como as pleurisias – que são inflamações das membranas pleurais, que causa aderências fibrinosas ou fibrosas entre os lobos pulmonares e a parede externa – levando a grandes perdas econômica. O animal, afetado por esta patologia, mesmo tendo melhora no quadro clínico, tem como consequência o atrasos na idade para abate e com a permanência da lesão, sendo percebida somente nos abatedouros, ocasionando a redução na velocidades nas linha de abate, aumentando nos resíduos e retrabalho. Uma vez diagnosticada a lesão, a carcaça com esta patologia é desviada da linha e direcionadas ao Serviço de Inspeção Federal, podendo receber aproveitamento condicional ou mesmo ter a carcaça totalmente condenada (4).

Os principais agentes causadores da pleurisia são *Haemophilus parasuis* (HPS), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Streptococcus suis* (*S. suis*) e *Bordetella bronchiseptica* (BB) (5). Destes a *P. multocida* destaca-se como agentes patogênicos mais encontrados em carcaças desviadas ao DIF, tanto a *P. multocida* tipo D quanto a *P. multocida* tipo A (6). Estima-se que as perdas econômicas na cadeia suína brasileira, com pneumonias, pleurisias e aderências sejam de R\$ 216 milhões

anuais, e destes, um quinto seja ocasionado pela *P. multocida*, o que resulta aproximadamente em 43 milhões anuais (6).

Outro fator importante é que além da *P. multocida* estar relacionadas com pleurites ela também está associada com rinite atrófica e pneumonias, provavelmente devido à alta variabilidade genética e patogenicidade dos isolados de *P. multocida* associados a doenças respiratórias dos suínos (5). Nos rebanhos brasileiros de suínos, há evidências da presença de diferentes perfis patogênicos da *P. multocida* no campo, com cepas geneticamente diferentes podendo ser uma das razões para a particular importância da doença no país e as dificuldades encontradas para o seu controle (9).

Atualmente o controle para essas patologias respiratórias é realizado com o uso de vacinas e/ou antibióticos contra os principais patógenos. Autores como Straw 1992 (21) recomenda que antes de optar por um destes métodos de controle (vacinação e/ou uso de antibióticos) deve-se fazer um antibiograma prévio, ou a sorotipagem da bactéria para verificar se a vacina com o antibiótico irá funcionar, e assim garantir que não ocorre a quebra de sensibilidade do controle. Além disso novos trabalhos estão mostrando uma interação entre o efeito da genética do animal em relação à resposta vacinal, podendo está ser uma alternativa para a melhorar a eficácia de determinados tratamentos à enfermidades (8).

Diante do exposto o objetivo principal deste trabalho é a investigação dos agentes bacterianos causadores das pleurisias por região no país e fase de desenvolvimento dos suínos, torna-se imprescindível para prever com mais assertividade técnicas de manejo para prevenir a incidência desses agentes, ou mesmo tratar mais precocemente e com drogas específicas em animais que possam vir a ter essa lesão e assim diminuir as percas econômicas e contribuir para os avanços da suinocultura brasileira. Também, a avaliação da *P. multocida* como agente causador da lesão, já que está sendo responsável por gerar as maiores perdas econômicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUINOCULTURA NO BRASIL

A carne suína consolidou-se como a mais importante fonte de proteína animal do mundo após 1978. No cenário mundial destacam-se como os maiores produtores a China com 56,6 milhões de toneladas, em 2º a União Europeia com 22,40 milhões de toneladas em 3º os Estados Unidos com 10,4 e em 4º o Brasil com 3,49 milhões de toneladas. Desde total do Brasil 85,8% da produção é estimada para o consumo interno e apenas 14,11% para a exportação (1). Entre os estados Brasileiros produtores de suínos, Santa Catarina é o maior produtor de carne suína do Brasil, responsável 26,68%, seguido do Rio Grande do Sul com 22,13%, Paraná 20,04%, Minas Gerais 11,45%, região Centro-Oeste (MS, MT e GO) e a região Sudeste (SP, RJ, ES e BA) com 5,4% (2).

De modo geral a suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, cresceu significativamente, principalmente nos últimos quatorze anos. Este crescimento pode ser observado, pelos indicadores econômicos e sociais, como volume de exportações, participação no mercado mundial, número de empregos diretos e indiretos, entre outros. Segundo estimativas mais de 730 mil pessoas dependem diretamente da suinocultura, e 2,7 milhões de pessoas indiretas do ramo. A produção está dividida em 64% granjas comerciais (equivalente a 1,6 milhões de matrizes) e 36% em criações de subsistência (870 mil porcas). Assim a atividade de suinocultura é considerada uma atividade essencial para a economia deste país (3).

Na contra mão do cenário apresentando, a suinocultura também tem enfrentados problemas que causam perdas diretas para às indústrias e aos produtores, relacionados com gastos em medicamentos, baixos índices zootécnicos e condenações de carcaças nos matadouros devido as doenças respiratórias principalmente as denominadas pleurísias. Estima-se que as perdas econômicas na cadeia suína brasileira, com pneumonias, pleurísias e aderências sejam em torno de R\$ 216 milhões anuais (6).

2.2 PLEURA

A pleura é uma serosa que possui dois folhetos, um visceral que envolve intimamente os pulmões, e que a partir dos hilos pulmonares se reflete para revestir internamente cada hemitórax, constituindo o folheto visceral. O folheto parietal, recobre diferentes regiões anatômicas, sendo descritas as seguintes porções: cervical, costal, diafragmática e mediastínica. Entre os dois folhetos encontra-se a cavidade pleural que em condições fisiológicas corresponde a um espaço virtual onde circula uma diminuta quantidade de líquido pleural essencial para a redução da fricção entre os folhetos, bem como para o jogo de pressões durante os movimentos respiratórios (11).

Segundo Lopes, 1998 (12), o tecido pleural é suscetível a danos causados por disseminação hematogênica de organismos infecciosos ou por extensão direta de processos inflamatórios adjacentes. Durante a fase aguda da pleurisia um exsudato fibrinoso é visível em superfícies pleurais. Ao longo do tempo, a cura ocorre e a fibrina é transformada em tecido fibroso colagenoso.

O folheto parietal é irrigado pela circulação sistêmica, através de vasos provenientes das artérias intercostais, mamária interna, pericardiofrênicas, frênicas superiores musculofrênicas, retorno venoso, feito pelas veias ázigo, hemiázigos e mamárias internas. Já o folheto visceral tem irrigação proveniente das artérias pulmonares e de ramos das artérias brônquicas, retorno venoso, é feito pelas veias pulmonares e brônquicas (13).

2.3 PLEURISIAS

Pleurisias é um termo que define a inflamação da pleura do pulmão que causa aderências fibrinosas ou fibrosas podendo causar perdas diretas para às indústrias e aos produtores com gastos em medicamentos, baixos índices zootécnicos e condenações de carcaças nos matadouros (14).

Esta patologia pode ser localizada, ou tornar-se generalizada. Durante a fase aguda da pleurisia um exsudato fibrinoso é visível em superfícies pleurais. Ao longo do tempo, os animais melhoram, e a fibrina é transformada em tecido fibroso colagenoso conforme apresentado na Figura 1A e 1B. Quando há danos causados pela disseminação hematogênica de organismos infecciosos que afeta diretamente a pleura, sem o envolvimento pulmonar, como em poliserosites causadas pelo HPS o agente etiológico da Doença de Glässer, ou

indireta, através de infecções secundária que atinge os pulmões e a pleura resultando como extensão direta de processos inflamatórios adjacente, como broncopneumonia fibrinosa (11).

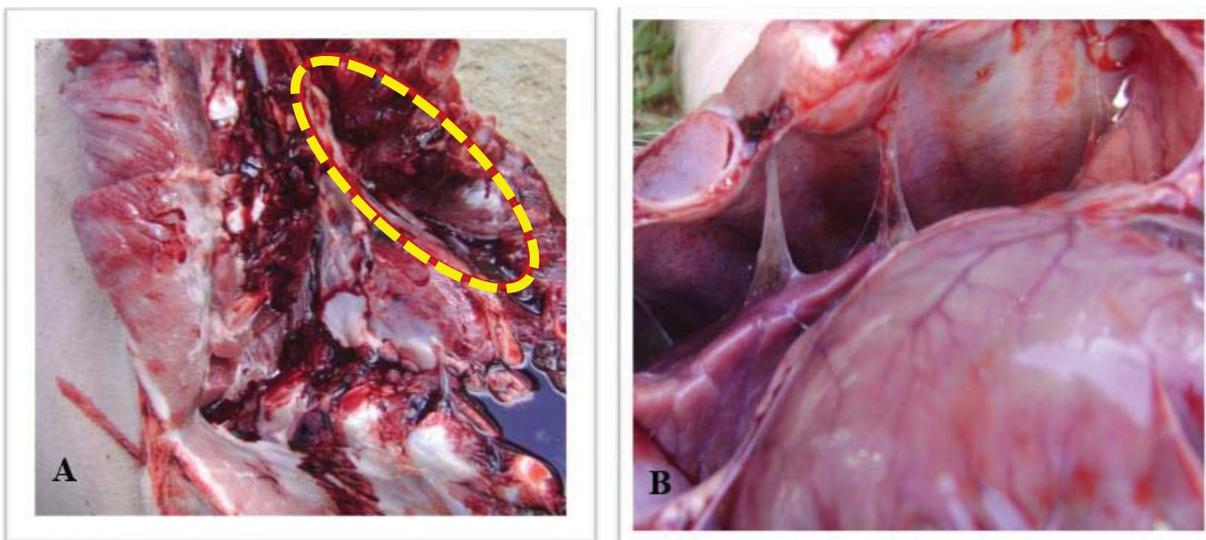


Figura 1. Pleurisia em suíno com 60 dias de alojamento (A) Lesão de aderência da pleura, pericardite; (B) Fase aguda da pleurisia um exsudato fibrinoso é visível em superfícies pleurais. Fonte: Nascimento, E. R. M. (2015)

De modo geral os principais agentes infecciosos de pleurites nos suínos são os HPS, *P. multocida*, APP, *S. suis* e a BB (5).

O APP, é o agente causador da pleuropneumonia suína que afeta principalmente suínos entre 70 a 100 dias de alojamento. Geralmente animais mais velhos e principalmente na fase de terminação, apresentam a forma crônica da enfermidade (15). A doença é preocupante porque causa pneumonia grave levando a morte desde animais ou doença clínica crônica e formas subclínicas, levando a prejuízos zootécnicos (16).

As lesões relacionadas ao agente *S. suis*, são broncopneumonias purulentas, quando a infecção ocorre via aerógena, ou pneumonias intersticiais, consequentes a casos de infecção generalizada grave (septicemia). Este agente também tem sido encontrado causando infecções em humanos (17-18).

A BB é um agente causador de broncopneumonias em suínos jovens. O isolamento deste agente em suínos mais velhos, em terminação, não é frequente, sendo que nestes casos é considerado um patógeno secundário, oportunista, e a significância dos isolados é desconhecida (18).

Atualmente o controle para estas patologias respiratórias é a prevenção com a imunização materna, e/ou imunização com vacinas, e/ou uso de antibióticos contra os

principais patógenos (conforme o caso, pelo menos durante os primeiros 8-10 semanas de vida). Além disso, alguns fatores, como a dieta do animal, a estrutura do rebanho ou manejos durante o parto também pode afetar essa transferência de imunidade materna. Porém o uso de antibióticos apresentam os riscos de resistências, resíduos e/ou reações locais. O isolamento da bactéria é necessário para estabelecer a sensibilidade. Para o APP, já existe resistência à ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol, principalmente nos sorotipos 1, 3, 5 e 7. Para alguns antibióticos já é recomendado uma dosagem maior, como a estreptomicina, kanamicina, espectinomicina, espiramicina e lincomicina (18).

Nestes sentidos alguns autores como Straw, 1992 (19) recomenda que antes de optar por um destes métodos de controle (vacinação e/ou uso de antibióticos) deve-se fazer um antibiograma prévio, ou a sorotipagem da bactéria para verificar se o antibiótico ou a vacina irá funcionar, e assim garantir que não ocorre a quebra de sensibilidade do controle. Além disso novos trabalhos estão mostrando uma interação entre o efeito da genética do animal em relação à resposta vacinal (8).

2.4 PASTEURELLA MULTOCIDA

2.4.1 Características da *P. multocida*

P. multocida é um cocobacillus, gram negativo, anaeróbico facultativo que coloniza a nasofaringe de muitos animais domésticos e selvagens. Em suínos, o agente faz parte da microbiota anfibiótica (flora normal) das narinas, mas não é considerada parte da microbiota normal do pulmão (20). Tem ocorrência em vários tipos de clima e condições de criação e sua importância como agente primário de pneumonia em suínos tem sido bastante discutida.

Segundo Pijoan e Fuentes, 1987 (26), o microrganismo é incapaz de agir como patógeno primário, necessitando da interação com outros agentes para produzir pneumonia (como adenovírus, vírus da Peste Suína Clássica, vírus da PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae* e vírus da Doença de Aujeszky). Entretanto, trabalhos recentes apresentam a *P. multocida* como agente primário, causando pneumonia, serosites e pleuropneumonia necrosupurativa em suínos. Adicionalmente, algumas amostras causam septicemia e outras exclusivamente lesões de pleurite, sem evidências de pneumonia (10).

Segundo Alwis, 1992 (22) a *P. multocida* pode causar várias doenças que são

importantes economicamente, incluindo a cólera aviária, septicemia hemorrágica bovina, pneumonia enzoótica e rinite atrófica suína. Podendo ser caracterizada pelos antígenos capsulares em cinco sorotipos (A, B, C, D e E). Os sorotipos A, B e D já foram descritos em suínos. As cepas relacionadas com a rinite atrófica progressiva pertencem aos sorotipos capsulares A e D, através da presença da toxina dermonecrótica (19-20).

Os casos de pneumonias e pleurites estão relacionados principalmente com o sorotipo A e com menor frequência com D (25). Entretanto, trabalhos vêm apresentando aumento nos registros de frequência de casos em que se associou a *P. multocida* cepas do tipo D com pleurite e pneumonia no Brasil foram estudados por Mores, 2006 (6), em que se avaliou 162 pulmões de suínos abatidos e rejeitados por lesões de pneumonia e pleurite e foram encontrados 24% das amostras de *P. multocida* do tipo A e 27% de *P. multocida* tipo D.

2.4.2 Fatores De Virulência

A virulência é a capacidade relativa de um patógeno em causar doença. Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, os quais propiciam a colonização e a ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira (23).

Os componentes estruturais das bactérias apresentam diferentes funções, mas também podem auxiliar na patogênese, atuando como fatores de virulência. Diversos componentes microbianos intra e extracelulares atuam unicamente como fatores de virulência. Os genes que codificam tais fatores são divididos em três categorias: os genes de virulência verdadeiros, responsáveis diretos pelos danos celulares provocados, os genes associados à virulência que regulam ou ativam a expressão da classe anterior, e os genes relacionados à patogênese do microrganismo, que auxiliam na colonização, na invasão e na sobrevivência intracelular durante o processo infeccioso (24).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para identificação de genes relacionados à virulência em *P. multocida* (27). Contudo, a frequência destes genes em diferentes hospedeiros ainda é pouco conhecida. Além disto, os genes identificados podem ser classificados como virulentos somente na espécie animal testada, pois alguns fatores considerados fundamentais em alguns hospedeiros não são essenciais nos demais (29).

2.4.2.1 Cápsula

A diversidade dos polissacarídeos capsulares tem importância na patogênese das doenças sistêmicas. As amostras de *P. multocida* possuem uma cápsula similar à observada na superfície celular de várias espécies bacterianas, composta por polissacarídeos polianiônicos altamente hidratados, que se ligam covalentemente a superfície celular por moléculas de lipídio A (21).

As cápsulas de *P. multocida* pode ser classificada por meio em cinco grupos designados por A, B, D, E e F. Nos suínos somente os tipos capsulares A e D costumam estar associados a rinite atrófica e pneumonias. Os genes requeridos para a síntese e transporte dos tipos capsulares são codificados dentro de uma única região do genoma (27).

A cápsula desempenha um papel significativo na resistência a virulência, pois as que apresentam capsula tem maior resistência a fagocitose e ao efeito bactericida do complemento (30).

2.4.2.2 Lipopolissacarídeo

Os lipopolissacarídeos da *P. multocida* desempenham um papel crucial na patogênese da doença. Ele estimula a imunidade humoral e é considerado como um antígeno protetor. O lipopolissacarídeo (LPS) é um importante componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram negativas e é composto por três regiões: cadeia de polissacarídeos (antígenos O), oligossacarídeo (região do core) e molécula lipídica (lipídeo A). LPS, assim como a cápsula, apresenta importante papel na virulência. Qualquer mutação que gere a menor expressão gênica dos oligossacarídeos do LPS representa a diminuição de virulência das amostras de *P. multocida* nos casos de Cólera Aviária (27).

A estrutura do LPS de *P. multocida* do sorotipo A:1, mais comumente estudada, demonstra a existência de duas formas diferenciadas de oligossacarídeos na estrutura nuclear do core (31). A expressão simultânea destas duas estruturas é somente descrita em *P. multocida* e representa possivelmente uma vantagem à sobrevivência da bactéria no ambiente (27). Também a presença de resíduos de fosfocolina ligados aos oligossacarídeos do core em algumas amostras de *P. multocida* auxiliam na maior adesão da bactéria às mucosas hospedeiras e na maior resistência aos antimicrobianos (31). O LPS é considerado uma endotoxina, entretanto a toxicidade varia de acordo com o tipo de hospedeiro infectado pela *P. multocida* (25).

2.4.2.3 Fímbrias e adesinas

As fímbrias são estruturas proteicas presentes na superfície das células procarióticas e que conferem à bactéria a capacidade de adesão. A maioria das fímbrias bacterianas apresenta uma forte afinidade adesiva pela superfície de hemácias e outros tipos de células de animais, plantas e fungos (32). Como a interação entre macromoléculas presentes na superfície das células hospedeiras e do patógeno são essenciais para o estabelecimento da colonização de tecidos lesados, as fímbrias são consideradas fatores de virulência (27).

Muitos genes de *P. multocida* que codificam fímbrias e adesinas, incluindo *ptfA*, *fimA*, *hsf1* e *hsf2*, são semelhantes às encontradas em outras bactérias (31). A maioria dos estudos é concentrada no isolamento e caracterização da fímbria do tipo IV (proteína *ptfA*) responsável pela ligação da *P. multocida* à superfície das células hospedeiras.

Alguns estudos também demonstram a existência de dois genes, *pfhaB1* e *pfhaB2*, que codificam hemaglutininas filamentosas importantes na colonização do trato respiratório superior e que também são encontrados na bactéria *Bordetella pertussis*. A mutação de *pfhA* resulta em diminuição de virulência das cepas de *P. multocida* (33).

É provável que as fímbrias desempenhem um papel na adesão de superfície, como sendo capazes de aderirem ao epitélio da mucosa, mas não sobre a superfície das referidas estirpes incapazes de aderir. Fímbrias de tipo IV foram isoladas e caracterizadas a partir de *P. multocida* sorotipos A, B e D (34) são frequentemente associadas com a virulência em outras bactérias devido ao seu papel na fixação para acolher superfícies celulares.

2.4.2.4 Toxinas

Em geral, a maioria das cepas de *P. multocida* que causam cólera aviária, septicemia hemorrágica e pneumonia não são conhecidos por expressar quaisquer toxinas. A toxina dermonecrótica, PMT, expressa principalmente por estirpes do sorogrupo D, é a única toxina identificados até à data e é responsável pelos sinais clínicos e patológicos da rinite atrófica (23).

A toxina PMT atua intracelularmente através da modulação da subunidade Gαq no fosfolipase C via de transdução de sinal. Em suínos, isto leva a atrofia dos cornetos nasais, onde ocorre a reabsorção do osso, devido à proliferação descontrolada de osteoclastos, e a regeneração de osso é evitada pela inibição de osteoblastos (35). PMT ativa as células dendríticas para células maduras, mas, ao contrário das outras toxinas, que parece suprimir a resposta de anticorpos.

2.4.2.5 Ferro regulamentada e proteínas de aquisição de ferro

O ferro é um elemento essencial que deve ser adquirida por bactérias, a fim de sobreviver. Devido à sua toxicidade inerente, o nível de ferro livre “*in vivo*” disponíveis é bastante limitada e *P. multocida*, como outras espécies bacterianas, tem desenvolvido vários mecanismos para a absorção de ferro (28).

Receptores de transferrina utilizados por espécies bacterianas nas famílias de *Pasteurellaceae* e *Neisseriaceae* que consiste de um receptor, composto por duas proteínas chamada de *tbpA* e *tbpB* (41). No entanto, este receptor pode não estar presente em todas as estirpes de *P. multocida*; um estudo recente de PCR e hibridação de DNA descobriram que o gene *tbpA* está presente apenas em alguns isolados clínicos das espécies bovina e ovina (29).

Sabe-se que as proteínas de aquisição de ferro desempenham um papel no processo da doença, em que mutantes sorogrupo A com proteínas *exbB*, *exBD*, *tonB*, ou *hgbA* inativadas são atenuados em ratos (33). Estas proteínas fazem parte do complexo de transporte *tonB*, necessária para transportar e fornecer a energia para o sequestro de ferro, e *hgbA* é uma proteína de ligação à hemoglobina necessária para a aquisição de ferro a partir de proteínas do hospedeiro (41).

2.4.2.6 Sialidases

O ácido siálico promove a estabilização das membranas celulares, o armazenamento de energia na forma de glicogênio ou amido e atua como mediador na adesão celular e como receptor para bactérias e vírus (24).

As sialidases ou neuramidases são enzimas produzidas por algumas bactérias com o objetivo de remover o ácido siálico das células hospedeiras para utiliza-lo como fonte de carbono (31). A maioria das cepas de *P. multocida* produz estas enzimas. Estas enzimas podem aumentar a virulência bacteriana por atuar nos receptores-chave de acolhimento ou reduzir a eficácia de defesas do hospedeiro.

2.4.2.7 Proteínas da membrana externa (OMPs)

As proteínas de membrana agem como barreiras seletivas que impedem a entrada de moléculas tóxicas na célula, que é crucial para a sobrevivência de bactéria em muitos

ambientes. Ao mesmo tempo, elas exercem vários papéis na célula bacteriana, como absorção de nutrientes, transporte de moléculas, além de interagir com o tecido do hospedeiro e com o ambiente (37).

O interesse nas OMPs é devido a suas propriedades imunogênicas, em que estudos mostraram que uma proteína de 37 kDa apresentava proteção baseados em primeiro lugar sobre os resultados de radioimunoprecipitação utilizando soro de coelho imune, e em segundo lugar na sua localização na membrana externa (37). Uma proteína de massa molecular semelhante (39 KDa) foi identificada no *P. multocida* A:3 P1059 em que a sua expressão foi mostrada para correlacionar com a presença e quantidade de cápsula presente na célula (37).

Uma das principais proteínas da membrana externa de *P. multocida* é *ompH* em que anticorpos produzidos contra esta proteína fornece alguma proteção contra a doença. Recentes estudos que examinaram a capacidade de *P. multocida* de se ligar a proteínas da matriz extracelular demonstraram que as bactérias podem aderir à fibronectina e colágeno de tipo IX. As proteínas identificadas como possíveis adesinas incluem *ompA*, *oma87*, Pm1069 e as proteínas relacionadas com ferro, *tbp* (proteína de ligação de transferrina) e o receptor putativo tonB *hgbA* (37).

OmpA é uma proteína em formato de β -barrel, e que constitui de um canal para o transporte de íons que foi especificamente identificado como tendo um papel direto na adesão. Os homólogos desta proteína são importantes adesinas em *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e outras bactérias. Notavelmente, recombinante *P. multocida* OmpA se liga a células de rim de bovino e interage com a matriz extracelular de acolhimento moléculas de heparina e fibronectina (37).

2.5 ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são medicamentos que atuam causando a morte ou a inibição do crescimento de microrganismos. Podem ser administrados em animais para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças infecciosas e, também, como aditivos, neste caso visando melhorar o desempenho zootécnico de animais de produção (38). São utilizados há mais de 70 anos no tratamento de doenças infecciosas e o seu uso é benéfico e, quando administrados corretamente, seu valor é enorme, mas alguns microrganismos podem desenvolver resistência tanto a um único antibiótico quanto a uma associação deles (39).

A resistência aos antimicrobianos é um dos grandes problemas da medicina e da

medicina veterinária, e é causada basicamente pela evolução das bactérias, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos (40).

A ampicilina, amoxicilina são antibióticos β -lactâmicos e possuem, no seu núcleo estrutural, o anel β -lactâmico, que confere atividade bactericida (40). A ampicilina pertence à classe das penicilinas e é um bactericida que atua na parede celular agindo contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo a *P. multocida*.

Ciprofloxacina é um antibiótico sintético pertencente ao grupo dos quinolônicos, tem mecanismo de ação que inibe a DNA-girase bloqueando o metabolismo bacteriano, uma vez que informações vitais não mais podem ser lidas a partir do cromossomo bacteriano.

Já as tetraciclinas agem inibindo a síntese proteica dos organismos sensíveis, impedindo a fixação do RNA mensageiro, para que os microrganismos não consigam se multiplicar.

A enrofloxacin pertence ao grupo das quinolonas, que inibem a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana (6). Já a neomicina pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, que se ligam à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas (6).

Tilmicosina é pertencente aos grupo dos macrolídeos, apresenta um espectro de ação limitado, agindo em bactérias Gram positivas, micoplasma e anaeróbias. São denominados de bacteriostáticos (41).

A ação bacteriostática ou bactericida pode ser potencializada quando ocorrer um contato com microrganismos bastante sensíveis ou em concentrações bem elevadas (39). No ano de 2012 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento proibiu em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal (38).

3. CAPÍTULO 1

Identificação e distribuição dos agentes causadores de pleurisia na suinocultura brasileira.

Enio Rivelino Maria Nascimento¹, Ricardo Zanella⁶, Lucas Fernando dos Santos², Rosalí Ebertz³, Laurinda Mara Ribeiro⁴, Diego Finamor Nascimento⁵, Eraldo Lourenso Zanella^{1*}

(Artigo submetido para a Pesquisa Agropecuária Brasileira)

¹Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²Microbiologia Veterinária Especial LTDA (Microvet), Viçosa, MG, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação na Universidade do Planalto Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.

⁴UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Sinop, MT, Brasil.

⁵Programa de Graduação em Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

⁶ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: ezanella@upf.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar, quantificar e verificar a associação da prevalência das lesões de pleurisia por agentes bacteriano, por localização geográfica e fase desenvolvimento dos suínos. Para tal foram avaliados 4.536 laudos anatomopatológicos e bacteriológico nas principais regiões produtoras brasileiras nos anos de 2013/2014. Sendo classificados os isolados conforme o agente (*Pasteurella multocida* – *P. Multocida*, *Haemophilus parasuis*- HPS, *Actinobacillus pleuropneumoniae* - APP *Streptococcus suis* - *S. suis*, e *Bordetella bronchiseptica*-BB), a fase de desenvolvimento dos animais e a localização regional do caso. Os dados foram submetidos a análise de frequência e os grupos comparados pelo teste Fisher ($p<0,05$). Do total de laudos clínicos avaliado 10,63% apresentaram lesões de pleurisia. Desde total foram isolados HPS representou 55,0 %; *P. multocida* 31,0%; *S. suis* 7,0%; APP 6,0% e BB 1,0%. Observou-se maior prevalência de HPS nos estados da região Sul, enquanto que em MG, Sudeste e Centro-Oeste obteve-se o mesmo resultado percentual entre os isolamentos da *P. multocida* e HPS. A prevalência da HPS ($p<0,05$) ocorre na fase creche. Já *P. multocida* e APP prevaleceu na fase de crescimento e terminação. Devido a fase de maior prevalência da *P. multocida*, torna-se o agente mais relevante economicamente, pois no caso do HPS ocorre uma reparação das lesões com o decorrer do tempo, não sendo identificado com idades mais tardias até o abate do suíno.

Termos para indexação: Pleurisia, prevalência, suínos, *P. multocida*.

Abstract

Identification and distribution of causative agents of pleurisy in the Brazilian pig farming.

The objective of this study was to identify, quantify and verify the association between prevalence of lesions and bacterial agent, state and development swine phase. For such, 4,536 pathology and bacteriology reports in the main Brazilian producing regions in the years 2013/2014 were evaluated. The isolates were classified according to the agent (*Pasteurella multocida* - *P. multocida*, *Haemophilus parasuis* - HPS, *Streptococcus suis* - *S. suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* - APP and *Bordetella bronchiseptica* - BB), stage of development and regional location of the case. Data were subjected to frequency analysis and the groups were compared using Fisher test ($p < 0,05$). The observed clinical cases showed 10.63% pleurisy lesions. Of the total isolates, HPS represented 55.0% of the total; *P. multocida* 31.0%; *S. suis* 7.0%; APP 6.0% and BB 1.0%. The higher prevalence of HPS was in southern states, while in MG, Southeast and Midwest there was equality between isolations of *P. multocida* and HPS. The prevalence of HPS ($p < 0.05$) was in the nursery phase. *P. multocida* and APP prevailed in the growth phase and termination. Due to the phase of higher prevalence, *P. multocida* becomes economically the most important agent, since the HPS lesions are repaired over time, having low identification at later ages and slaughter of the pig.

Index terms: pleurisy, prevalence, pigs.

Introdução

Pleurisias são denominações dadas às aderências fibróticas localizadas entre as membranas visceral e parietal do saco pleural, causados por várias infecções, sendo considerado uma síndrome multifatorial, com agravo para os fatores de riscos como

densidade, mistura de lotes, origem e procedência dos suínos. Estas lesões estão entre as alterações patológicas mais frequentemente encontradas em abates de suínos (Lopez et al., 2007). A inflamação da pleura também pode ser causada por irritações físicas, tais como tumores ou abscessos, mas estes são raros em suínos no abate.

Os animais quando destinados ao abate, que são identificados com lesões de pleurisia são desviados da linha para avaliação mais detalhada pelo Serviço de Inspeção Federal, podendo receber aproveitamento condicional ou mesmo ter a carcaça totalmente condenada. As carcaças que apresentam alterações com repercussão no seu estado geral, devem ser condenadas e as carcaças com lesões localizadas, sem afetar o estado geral da carcaça, são destinadas ao aproveitamento condicional, com tratamento pelo calor, após a condenação das áreas atingidas e devidamente carimbadas para a identificação (Brasil 2014). Estima-se que as perdas econômicas na cadeia suína brasileira, com pneumonias, pleurisias e aderências sejam de R\$ 216 milhões anuais, e destes, um quinto seja ocasionado pela *P. multocida*, o que resulta aproximadamente em 43 milhões anuais (Morés, 2006).

Entre os principais agentes bacterianos causadores da pleurisia, destacam-se o *Haemophilus parasuis* (HPS), a *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), o *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), o *Streptococcus suis* (*S. suis*) e a *Bordetella bronchiseptica* (BB) que podem causar uma pleurisia fibrinosa aguda com ou sem pneumonia e sendo identificados como possíveis fatores de risco (Cleveland et al., 2002).

O diagnóstico de pleurisia em suínos é bastante difícil, pois geralmente os distúrbios patológicos do sistema respiratório apresentam-se sem sinais clínicos, podendo evoluir para o óbito ou apresentar uma melhora com a permanência da lesão de pleurisia visível somente no abate (Andreasen et al., 2001). Nas observações de necropsias e em avaliação anatomopatológica do pulmão, verifica-se uma pleurisia fibrinosa crônica, com aderência interlobular. Está característica identifica a lesão, mas não o agente, pois há vários agentes

bacterianos e virais envolvidos ou a coexistência deles na mesma lesão (Augustin et al., 2008).

Compreender os fatores de riscos e os sinais clínicos nos suínos vivos com pleurisia permitem uma maior eficácia e uma segmentação oportuna de medidas de controle, pois muitas vezes a doença é apenas aparente em abate (Augustin et al., 2008).

Neste sentido o presente estudo objetiva avaliar a prevalência dos agentes bacterianos causadores da lesão pleurítica de acordo com a fase de desenvolvimento do animal, bem como a distribuição geográfica nos estados com maior concentração suína no Brasil. Com isto, podemos prever com mais assertividade a ocorrência e, definir técnicas de manejo, para prevenir a incidência desses agentes, ou mesmo tratar mais precocemente e com drogas específicas.

Material e Métodos

As amostras foram coletadas de 4536 animais abatidos de granjas de suínos integrados com agroindústrias ou cooperativas e de produtores independentes dos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, região Sudeste (São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro) e Centro Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás) que apresentavam sintomatologia respiratória, nervosa e febre, foi realizado a necropsia e coletados os pulmões e porções fibrinóticas de pleura. Após a coleta, o material foi identificado, com informações da idade do animal e sua procedência, a sintomatologia e os possíveis exames a serem realizados.

O material foi devidamente embalado em caixas de isopor com gelo, e enviado ao laboratório Microvet (Viçosa-MG) onde foi realizada uma avaliação anatomopatológica dos órgãos. Após, estes materiais foram processados, realizando-se coletas com swabs de

porções das áreas afetadas, e inoculadas parte em meios de Agar Sangue e MacConkey (incubados a 37° em aerobiose por 24 a 48hs) e também somente em Agar Sangue, onde foi cruzada uma linha de semeadura de *Staphylococcus aureus* (incubadas em jarra em presença de CO₂ a 37°, 48 hs), visando o isolamento das principais bactérias causadoras de problemas respiratórios. As bactérias isoladas foram identificadas através do aspecto das colônias, presença de hemólise, crescimento em MacConkey, coloração por Gram, satelitismo em presença de *S. aureus*. A partir da caracterização dos isolamentos, realizou-se a descrição dos resultados em laudos de diagnósticos, sendo identificados os agente causadores da pleurisia (HPS, *P. multocida*, APP, *S. suis* ou BB).

A partir do total de exames, os dados foram agrupados e selecionados os que apresentavam lesões de pleurisia. Destes, foram reagrupados os agentes isolados de acordo com a localização geográfica por estado e/ou região do Brasil e por fase de vida do animal. Calculou-se o índice de ocorrência da pleurisia por estado conforme equação abaixo.

$$I = \left[\frac{(n.º amostra com pleurisia)}{n.º laudos por estado} \right] * 100$$

Para a classificação dos suínos em relação a fase de vida do animal foi realizada a distribuição conforme a idade dos mesmos, sendo classificado em 3 fases: dos 30 aos 70 dias compreende a fase de creche, dos 80 aos 120 dias a fase de crescimento e dos 130 aos 180 dias, a fase de terminação.

Todos os dados obtidos através destes laudos foram submetidos a análise de frequência e para verificar se havia relação entre a prevalência da pleurisia com os estados e a fase de desenvolvimento, os dados foram analisados e comparados pelo teste de Fisher (p<0,05) com o auxílio do programa SPSS (2014) e apresentado na forma de tabelas e gráficos.

Resultados e Discussão

Do total de 4536 exames observado de suínos, a pleurisia apresentou um índice médio de 10,63% do total de laudos analisados no laboratório de microbiologia. Quando analisados o índice por estado e/ou região observamos que este índice altera consideravelmente. O estado de SC apresentou um índice de 17,86% de ocorrência, ou seja, das doenças observados no estado 946 amostras 169 foram causado por pleurisia. Mores, 2006 avaliou 150 amostras de um frigorífico no estado de SC e observou um percentual de 12,7% de pleurisia, ou seja, demonstrando que este índice é elevado. O estado do RS, também apresentou um índice elevado de 14,09%. Já o estado de MG, PR e a região Sudeste e Centro Oeste apresentaram um percentual de 8,36 %, 6,88 %, 7,11 % e 7,09 % respectivamente.

Tabela 1. Ocorrência de Pleurisia por Estados no Brasil. UPF/RS, 2016.

Estado	Nº Exames com Pleurisia	Nº Exames por Estado	Índice Pleurisia Estado ⁻¹
SC	169	946	17,86
MG	122	1459	8,36
RS	83	589	14,09
PR	47	683	6,88
Sudeste	32	450	7,11
Centro Oeste	29	409	7,09
TOTAL	482	4536	$\bar{X} = 10,63$

* Representa a taxa de amostras com pleurisia do estado ou região em relação ao total de amostras com pleurisia.

Das pleurisias, foram identificadas cinco bactérias causadoras destas patologia, sendo 55,0% (263 amostras) correspondendo a HPS, seguido da *P. multocida* com 31% (150 amostras), APP com 7% (36 amostras), *S. suis* com 6% (29 amostras) e BB com 1% (4 amostras), conforme Figura 02. Dentre os patógenos causadores das pleurisias o HPS e a *P. multocida* são os agentes com maior prevalência, representando juntos, 86% das amostras, o que indica a necessidade de uma avaliação destas doenças, principalmente para se fazer indicações terapêuticas de programas vacinais ou pulsos medicamentosos.

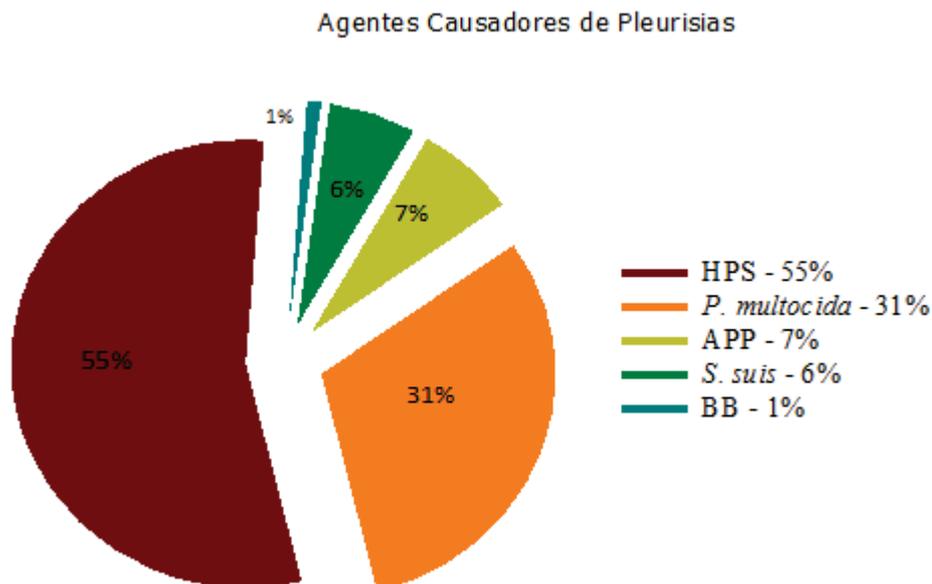


Figura 2. Prevalência dos agentes causadores de pleurisia no Brasil, HPS; *P. multocida*; APP; *S. suis* e BB. UPF/RS 2016,

Comparando a frequência da pleurisia com os estados de ocorrência, observamos que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual da prevalência dos agentes patógenos por região para HPS e *P. multocida*, ou seja, dependendo da região o HPS e *P. multocida* apresentam maior ou menor incidência. Para HPS observamos maior prevalência no estado do PR com 74,5% seguindo de SC com 61,5%, região Sudeste com incidência de 46,9%, MG com 43,8% e com menor incidência a região Centro Oeste com 37,9%.

Para *P. multocida* observamos maior incidência na região Sudeste com percentual de 53,1%, seguido do estado de MG com 40,5%; região Centro Oeste com 37,9%; RS com 31,3% e com menor incidência os estados de PR e SC com percentual de 21,30% para ambos.

Já para APP, *S. suis*, e BB não houve diferença significativa ($p > 0,05$) ou seja, ocorrência do patógeno não apresentou relevância com a região. Observamos que o APP apresentou percentuais de 10,3 %, 9,1%, 2,1%, 7,2 % e 8,9% na região Centro Oeste e estados de MG, PR, RS e SC respectivamente, não sendo isolada nas região Sudeste.

O *S. suis* apresentou ocorrência em todos as regiões com percentuais de 10,3%, 5,8%, 2,1% e 7,2% e na região Centro Oeste e os estados de MG, PR; RS, SC, respectivamente,

não apresentado na região Sudeste. A BB apresentou ocorrência somente na região Centro Oeste e no estado de MG com percentuais de 3,4 e 0,8% respectivamente (Tabela 2).

De modo geral quando comparamos a frequência dos agentes com a localização regional os estados do Sul do Brasil (SC, RS e PR) e Sudeste (SP, RJ e ES) tem prevalência maior de isolamentos de HPS, enquanto que nos demais estados nota-se uma igualdade em prevalências de *P. multocida* e HPS, mantendo-se as idades de exacerbação de cada uma. APP, *S. suis* e BB acompanham uma mesma tendência nas regiões do país. De acordo com Christensen (1981), supõe-se que a variação observada na frequência de pleurite crônica é causada por alterações no clima ambiental. Alta frequência é encontrada no verão, em animais abatidos, que tenham sido clinicamente afetadas durante a estação mais fria do ano. Fato que corrobora com os observados neste estudo. Além disso temperatura abaixo de 23 °C em animais alojados em terminação foram associados com o aumento do risco de pleurisia (Fablet et al., 2012). Estes resultados concordam com os achados de estudos anteriores onde as baixas temperaturas nominais durante a fase de crescimento e terminações foram associadas com lesões respiratórias (Madec e Josse, 1984; Stark et al., 1998). Baixas temperaturas, abaixo do conforto limiar, influenciam na capacidade do suíno para combater bactérias a partir do trato respiratório podendo aumentar a susceptibilidade à infecção de suínos (Fablet et al., 2012).

Tabela 2. Teste de Fisher Exact para prevalência dos agentes causadores de pleurisia por localização geográfica nos estados do Brasil: HPS; *P. multocida*; APP; *S. suis* e BB. Passo Fundo, UPF, 2016.

Agente	SC	MG	RS	PR	Sudeste	Centro Oeste
HPS	61,50%	43,80%	54,20%	74,50%	46,90%	37,90% *
<i>P. multocida</i>	21,30%	40,50%	31,30%	21,30%	53,10%	37,90% *
APP	8,90%	9,10%	7,20%	2,10%	0,00%	10,30% ^{ns}
<i>S. suis</i>	7,10%	5,80%	7,20%	2,10%	0,00%	10,30% ^{ns}
BB	1,20%	0,80%	0,00%	0,00%	0,00%	3,40% ^{ns}

* p<0,05 significativo; ^{ns} não significativo.

Na avaliação por estado e região observamos que a prevalência dos isolados por idade houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), ou seja, dependendo da fase de desenvolvimento dos animais e da região os isolados apresenta maior prevalência.

O estado de SC apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para associação dos isolados com a fase de desenvolvimento para o HPS, *P. multocida* e APP. Já as *S. suis* e BB não apresentaram diferença significativa. HPS a maior prevalência na fase de creche com 81,7% da ocorrência, seguido de 15,4% na fase de crescimento. Para a *P. multocida* observamos maior prevalência na fase de terminação com 44,4% seguido de 36,1% na fase de crescimento e menor prevalência observada na fase da creche com 19,4%. Resultados similar observado para APP com maior prevalência na fase de terminação com 53,3% e na fase crescimento com 40% e a menor prevalência observado na fase creche com 6,7%. Para *S. suis* e BB observamos uma frequência de 50% de ocorrência na fase creche para ambas, e de 25% e 50% na fase de crescimento, respectivamente e de 25% somente para a *S. suis*.

Para o estado de MG, foi observado valores significativos ($p < 0,05$) para a prevalência do HPS, *P. multocida* e APP. Para *S. suis* e BB não houve diferença significativa para a relação entre região, fase e cepas. Em MG a maior prevalência do HPS foi na fase creche com 83,0%, seguido da fase de crescimento e terminação com percentuais de 13,2 e 3,8%, respectivamente. Já para a *P. multocida* a maior incidência observado foi na fase de crescimento e terminação com percentuais de 44,9 e 34,7% respectivamente, totalizando 79,6% e a menor incidência na fase creche com 20,4%.

Para o estado do RS, observamos diferença significativa ($p < 0,05$) para a associação para as cepas HPS, *P. multocida* e APP. HPS apresentou maior prevalência na fase de creche com 82,2% seguido de 15,6 % na fase crescimento e a menor prevalência na fase de terminação com 2,2%. Já *P. multocida* a maior prevalência foi observado na fase de crescimento com 61,5% seguido de 26,9% na fase de terminação e com menor incidência

observada na fase da creche com 11,5%. Para APP observamos maior incidência na fase de terminação com 66,7% seguido de 16,7% de prevalência para as fases de creche e crescimento. Observando a frequência da *S. suis* constatamos que ocorreu maior prevalência na fase de terminação com 66,7% e 33,3% na fase de crescimento. Já para o BB não foi observado a ocorrência.

No estado de PR houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente para as cepas HPS e *P. multocida*. O HPS apresentou maior prevalência na fase de creche com 80% e 20% na fase de crescimento não apresentando incidência na fase de terminação. Resultados semelhante observado para a *P. multocida* porem, com maior ocorrência na fase de crescimento com 60% e 30 % na fase creche. Já para as cepas *S. suis* e APP observamos uma frequência de 100% de incidência na fase crescimento para ambas as cepas (Tabela 03).

A região Sudeste apresentou maior prevalência do HPS ocorre na fase creche com 86,7% e 13,3 % na fase de crescimento não sendo observado incidência na fase de terminação. Já para *P. multocida* a maior prevalência foi observada na fase de crescimento com 76,5% seguido da fase de terminação com 17,6% e 5,9% na fase creche. Para a *S. suis* não foram observados valores significativo considerando a fase na região Sudeste.

Para a região Centro Oeste, observamos valores significativos ($p < 0,05$) para a prevalência da HPS, *P. multocida* e *S. suis*. Para HPS observamos maior prevalência na fase de creche com 81,8%, seguindo da fase de crescimento e terminação ambas com 9,1%. Para *P. multocida* observamos maior prevalência na fase de crescimento e terminação ambas com 45,5% e apenas 9,1 na fase creche. Já para a *S. suis* observamos maior prevalência na fase de crescimento com 100% dos casos registrados nesta fase. Para a APP e BB não foi observado relação significativos ($p < 0,05$) para a fase de desenvolvimento do animal. Sendo que APP apresentou maior frequência na fase de terminação com 66,7% seguido de 33,3% na fase de crescimento não apresentado prevalência na fase creche. Para a BB foi observado

frequência de 100% na fase de terminação, não apresentado prevalência nas fases creche e crescimento.

Sabendo o agente causador da lesão baseado na idade do animal e na região do país, pode-se prever com mais assertividade técnicas de manejo para prevenir a incidência desses agentes, ou mesmo tratar mais precocemente e com drogas específicas em animais que possam vir a ter essa lesão. Também é fundamental a definição de critérios para avaliação de lesões identificadas em frigorífico, podendo ser liberada a carcaça sem prejuízos para o consumo, evitando condenações e perdas econômicas mesmo com o animal apresentando lesões.

Tabela 3. Comparação dos grupos quanto á prevalência dos agentes bacteriano por fase de desenvolvimento estado e/ou região brasileira: HPS; *P. multocida*; APP; *S. suis* e BB. Passo Fundo, UPF,2016.

Agente	Fase	SC	MG	RS	PR	Sudeste	Centro Oeste	Média
		%						
HPS	Creche ⁱ	81,7*	83,0*	82,2*	80,0*	86,7*	81,8*	82,57
	Cresc. ⁱⁱ	15,4	13,2	15,6	20,0	13,3	9,1	14,43
	Term. ⁱⁱⁱ	2,9	3,8	2,2	0,0	0,0	9,1	3,00
<i>P. multocida</i>	Creche	19,4*	20,4*	11,5*	30,0*	5,9*	9,1*	16,05
	Cresc.	36,1	44,9	61,5	60,0	76,5	45,5	54,08
	Term.	44,4	34,7	26,9	10,0	17,6	45,5	29,85
APP	Creche	6,7*	9,1*	16,7*	0,0 ^{ns}	-	0,0 ^{ns}	8,13
	Cresc.	40,0	18,2	16,7	100,0	-	33,3	41,64
	Term.	53,3	72,7	66,7	0,0	-	66,7	51,88
<i>S. suis</i>	Creche	50,0 ^{ns}	28,6 ^{ns}	33,3 ^{ns}	0,0 ^{ns}	43,8 ^{ns}	0,0 ^{ns}	31,14
	Cresc.	25,0	28,6	66,7	100,0	46,9	100,0	61,20
	Term.	25,0	42,9	0,0	0,0	9,4	0,0	12,88
BB	Creche	50,0 ^{ns}	100,0 ^{ns}	-	-	-	0,0 ^{ns}	50,00
	Cresc.	50,0	0,0	-	-	-	0,0	16,67
	Term.	0,0	0,0	-	-	-	100,0	33,33

* p<0,05 significância; ^{ns} não significativo. ⁱ Creche de 30 a 70 dias; ⁱⁱ Crescimento de 80 a 120 dias; ⁱⁱⁱ Terminação de 130 a 180 dias;

De modo geral comparando a frequência da fase de desenvolvimento dos animais

com os isolados, observamos que na fase de creche o HPS predomina com percentuais de 82,57% de prevalência do total diagnóstico com pleurisia. Segundo Sorensen (2006), pode ocorrer uma reparação de lesões fibrosas pleurais ao longo do processo com uma duração de pelo menos um mês e não apresentando lesões, até o momento do abate. O que minimiza a importância do HPS em pleurisia no abate pois as lesões pulmonares podem progredir e regredir ao longo da vida dos suínos, podendo estar resolvidas no momento do abate (NOYES et al., 1987. MEYNS et al., 2011). A Doença de Glässer ocorre tipicamente a uma idade de 8-10 semanas, e tem tempo suficiente para serem resolvidas antes do abate (MOUSING, J. 1990). Fato observado neste estudo, porém associando somente a cepa HPS como agente causadores da doença nesta fase de desenvolvimento.

Já para a *P. multocida* foi observado maior ocorrência na fase de crescimento e terminação com percentuais de 54,08% e 29,85%, correspondendo a 83,93% dos casos nestas fases. Comportamento similar observado para a APP com maior prevalência na fase de crescimento e terminação com percentuais de 41,64 e 51,88% respectivamente, assim representando 93,52% de ocorrência na fase crescimento e terminação (Tabela 03). Já a *S. suis* apresentou-se de forma esporádica, com maior frequência na fase creche e crescimento com percentuais de 31,14 % e 61,20%. Por último a BB apresentando percentuais 50%, 16,7% e 33,33%.

Conclusões

Na suinocultura, as doenças respiratórias tem grande impacto econômico, devido a perdas em conversão alimentar, mortalidades, gastos com medicamentos e condenações de carcaças em frigoríficos, entre outros. Um recurso valioso para os suinocultores são informações geradas ante morte com os sinais clínicos e no post mortem com avaliações em carcaças de frigoríficos que demonstrem com um conjunto de dados as informações sobre a prevalência da lesões de pleurisia.

Neste estudo, a partir da dados coletados de casos clínicos de diversos estados brasileiros, é um potencial para futuros pesquisas em diferentes aspectos da patologia em suínos, além de propiciar indicações o melhoramento de índices zootécnicos. Pode ser de grande valia para produtores e veterinários de suínos no planejamento de investigações de diagnóstico de pleurisia, visto que os dados foram obtidos de uma prevalência de 10,63% no total de exames, com destaque para os estados de SC e PR que apresentaram os maiores percentuais de ocorrência (17,86% e 14,09%).

Ressaltamos a importância da avaliação dos sinais clínicos juntamente com a idade de ocorrência, pois cada agente envolvido tem sua atuação em diferentes fases de vida do animal, devido também a imunidade materna que influencia na ocorrência da patologia. Conforme o observado neste estudo o HPS tem a prevalência na fase creche com 82,57% *P. multocida* e APP na fase de crescimento e terminação com 83,93% e 93,52%. Já o *S. suis* e BB independe da fase.

Verificamos que houve maior prevalência do HPS em regiões do sul do Brasil onde predominam temperaturas mais baixas se comparadas a outros estados do Brasil. Já em regiões de clima mais quentes, houve uma similaridade entre a os isolados de *P. multocida* na fase de crescimento e terminação e HPS na fase creche.

Referências

ANDREASEN, M. J.; MOUSING AND L KROGSGAARD THOMSEN. No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. **Preventive Veterinary Medicine** v.52, p.147-161. 2001.

AUGUSTIJN, M.;N. STOCKHOFE-ZURWIEDEN, M.; NIELEN, P.; JIRAWATTANAPONG, A.L.M.; CRUIJSEN, C.M.C.V.D.; PEET-SCHWERING, R.J.M.L.; RAYMAKERS, L.A.M.G.V. Leengoed. The etiology of chronic pleuritis in pigs: A clinical, pathological and serological study. **Int Pig Vet Soc Congress**, Durban: 196. 2008.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de**

Inspeção de Produtos de Origem Animal. PORTARIA Nº 914, de 12 de setembro de 2014. (nº 177, Seção 1, pág. 4).

CHRISTENSEN, G. Pleuropneumonia in pigs due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. I. A bibliographical review (author's transl). **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 33, p. 121, 1981.

CLEVELAND-NIELSE, A.; NIELSEN, E.O.; ERSBOLL, A. K. Chronic pleuritis in Danish slaughter pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v.55, p. 121-135, 2002.

FABLET, C.; DORENLOR, V.; EONO, F.; EVENO, J. P.; JOLLY, F.; PORTIER, F.; BIDAN, F.; MADEC, F.; ROSE, N. Noninfectious factors associated with pneumonia and pleuritis in slaughtered pigs from 143 farrow-to-finish pig farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v104, p.271-280, 2012.

LÓPEZ, A.G.; MCGAVIN, M.D.; ZACHAR, Y. J. F. **Respiratory system.** *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 2007. 463–558p

MADEC, F.; JOSSE, F. The risk factors of respiratory diseases on fatteners in intensive breeding-finishing units. Proc 8th Int Pig Vet Soc Congress, Ghent: 349. 1984.

MEYNS, T. J.; VAN, STEELANT, E.; ROLLY, J.; DEWULF, F.; HAESEBROUCK; MAES, D. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. **The Veterinary Journal** v187 (3) p. 388-392, 2011.

MORÉS, M, A. S. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos.** 2006. 91p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MOUSING, J.; LYBYE, H.; BARFOD, K.; MEYLING, A.; RONSHOLT, L.; WIUEBERG, P. Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v.9, p.107-119, 1990.

NOYES, E.P.; FEENEY, D.A.; PIJOAN, C. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. **J Am Vet Med** v.197, p.1025-1029, 1987.

SORENSEN, V.; JORSAL, S, E.; MOUSING, J. Diseases of the Respiratory System. Diseases of Swine. B. Straw, J.J.Zimmerman, S.D'Allaire, and D.J.Taylor. **Blackwell Publishing**, p.149-177. 2006

STÄRK, K. D. C.; PFEIFFER, D. U.; MORRIS, R. S. Risk factors for respiratory Disease in New Zealand pig herds. **New Zealand Veterinary Journal** v.46, p.3-10. 1998.

RESUMO

4. CAPÍTULO 2

Avaliação da diversidade genética e resistência de *Pasteurella multocida* isolados em pleurísias de suínos no Brasil.

Enio Rivelino Maria Nascimento¹, Ricardo Zanella⁶, Lucas Fernando dos Santos², Rosalí Ebertz³, Laurinda Mara Ribeiro⁴, Diego Finamor Nascimento⁵, Eraldo Lourenso Zanella^{1*}

(Artigo submetido ao congresso PorkExpo 2016)

¹Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²Microbiologia Veterinária Especial LTDA (Microvet), Viçosa, MG, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação na Universidade do Planalto Catarinense, Concórdia, SC, Brasil.

⁴UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Sinop, MT, Brasil.

⁵Programa de Graduação em Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

⁶Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: enio.nascimento@hotmail.com

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E RESISTÊNCIA DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLADOS EM PLEURISIAS DE SUÍNOS NO BRASIL.

Nascimento, E.R.M¹; Zanella, R⁶; Santos, L.F²; Ebertz, R³; Ribeiro, L.M.P⁴; Nascimento, D.F⁵;
Zanella, E.L^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS; ²Microbiologia Veterinária Especial LTDA (Microvet), Viçosa, MG; ³Programa de Pós-Graduação na Universidade do Planalto Catarinense, Concórdia, SC; ⁴UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Sinop, MT; ⁵Programa de Graduação em Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS; ⁶Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS. *Autor para correspondência: enio.nascimento@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Pleurisia, suínos, *Pasteurella multocida*.

INTRODUÇÃO

As doenças respiratória na suinocultura brasileira vem causando perdas econômicas substanciais na produção intensiva de suínos (1-2). Principalmente devido as lesões causada pela pleurisias que vem aumentando a ocorrência nos animais de terminação e no abate. Essas perdas refletem para o produtor e para os frigoríficos. Os animais acometidos com pleurisias geralmente necessitam de um tempo maior para estarem prontos ao abate, causando perdas econômicas para o produtor. Já nos abatedouros, as carcaças com pleurisias, são desviadas da linha e direcionadas ao DIF (Departamento de Inspeção Federal), que analisa os órgãos envolvidos e destina a carcaça. O critério sanitário, conforme a Portaria nº 914, de 12 de setembro de 2014 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, do Diário Oficial da União (DOU) de 15/09/2014, em seu Art. 376, dispendo sobre os processos inflamatórios das serosas, carcaças que apresentem alterações com repercussão no estado geral, deve ser condenada e as carcaças com lesões localizadas, sem repercussão no estado geral da carcaça, são destinadas ao aproveitamento condicional, com tratamento pelo calor.

Pleurisias, são aderências fibrinosos ou fibrosas entre os lobos pulmonares (pleurisia visceral) e entre pulmões e a parede externa (pleurisia parietal). O início da doença geralmente é repentino, sendo que alguns animais podem morrer sem demonstrar sinais clínicos, porem geralmente estão associados como tosse e letargia são considerados como indicativos, mas não específico de pleurisias (3). Sendo multifactoriais resultante da interação de vários agentes infecciosos, factores do hospedeiro e as condições ambientais e seu diagnóstico, monitorização e controlo (2).

Os principais agentes causadores da pleurisia são *Haemophilus parasuis* (HPS); *Pasteurella multocida* (*P. multocida*); *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP); *Streptococcus suis* (*S. suis*) e *Bordetella bronchiseptica* (BB) (4).

Entre as *P. multocida* encontrados em carcaças desviadas ao DIF, destaca-se a *P. multocida* tipo D que causa nódulos de tecido necrótico fibrinopurulento, normalmente de coloração amarelo creme, envoltos por uma cápsula fibrosa espessa, com ou sem envolvimento de pleura ou a *P. multocida* tipo A que apresenta nódulos de hepatização do parênquima pulmonar, com ou sem necrose, com exsudação mucopurulenta nos brônquios e bronquíolos e deposição de fibrina sobre a pleura visceral (5). Estima-se que as perdas econômicas na cadeia suína brasileira, com pneumonias, pleurisias e aderências sejam de R\$ 216 milhões anuais, e destes, um quinto seja ocasionado pela *P. multocida*, o que resulta aproximadamente em 43 milhões anuais (6).

A *P. multocida* é um agente que faz parte da microbiota comensal do trato respiratório superior do suíno e que algumas cepas estão relacionadas com a rinite atrófica dos suínos e outras com pneumonias e pleurites. É possível que a alta diversidade genética entre isolados de *P. multocida* associados a doenças respiratórias dos suínos possa influenciar na patogenicidade do agente (5). Nos rebanhos brasileiros de suínos, já há evidencia da presença de diferentes perfis patogênicos da *P. multocida* no campo, com cepas geneticamente diferentes podendo ser uma das razões para a particular importância da doença no país e as dificuldades encontradas para o seu controle (7).

Atualmente o controle para essas patologias respiratórias e a imunização com vacinas e/ou uso de antibióticos contra os principais patógenos. Autores como Straw 1992 (8) recomenda que antes de optar por um destes métodos de controle (vacinação e/ou uso de antibióticos) deve-se fazer

um antibiograma prévio, ou a sorotipagem da bactéria para verificar se a vacina com o antibiótico irá funcionar, e assim garantir que não ocorre a quebra de sensibilidade do controle. Além disso novos trabalhos estão mostrando uma interação entre o efeito da genética do animal em relação à resposta vacinal (9).

Neste sentido o presente trabalho tem como objetivo a identificação de *P. multocida* que ocasionam pleurisias, selecionados de diversos estados no Brasil, a fim de avaliar as diferenças entre os sorotipos *P. multocida* A e D, bem como a diversidade dentro do mesmo estado ou região e a avaliação da resistência e sensibilidade antimicrobiana da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre os anos de 2013 e 2014 foram selecionadas ao acaso trinta e seis amostras (n=36) da *P. multocida* A e D de um total de 482 amostras isoladas de pleurisia de suínos com idade entre 60 e 180 dias. As amostras foram selecionadas baseadas nos seguintes critérios: 18 amostras do tipo capsular A e 18 amostras do tipo D, visando abranger as principais regiões produtoras do Brasil foram distribuídas levando em consideração os estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Região Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás) e Região Sudeste (São Paulo e Espírito Santo) sendo igualmente amostrada 3 do tipo A e 3 do tipo D por estado. Nestas foram realizados os testes de sensibilidade aos antibióticos (resistência aos antimicrobianos).

Cultura bacteriana

Para este estudo foram utilizados isolados recuperados de casos clínicos de animais doentes pelo laboratório da empresa MICROVET (Microbiologia Veterinária Especial Ltda – Viçosa/MG) que gentilmente cedeu as amostras para esta pesquisa. Os isolados foram previamente identificados e classificados por testes bioquímicos neste laboratório. Foi realizada a cultura das bactérias em 2 ml de meio BHI durante 24 horas a temperatura de 37°C.

Extração e amplificação do DNA

O DNA foi extraído utilizando o Kit Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante.

A amplificação do DNA (PCR) foi realizada num volume final de 25µl, contendo 12,5 µl de GoTaq Master Mix, 2,5 µl de Box AIR primer (10) (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'), 5 µl de DNA e água ultra pura q.s.p.

PCR

Na realização da PCR utilizou-se o termociclador marca Biorad T100 Thermal Cycler com ciclos sucessivos iniciando com um ciclo de 3 minutos a temperatura 94°C para a desnaturação da dupla fita do DNA genômico para que permanecesse aberto, seguido de 35 ciclos sucessivos de 30 segundos a 94°C (desnaturação do DNA), 1:30 minutos de 52°C (anelamento) e 8:00 minutos a 72°C (extensão do primer) para hibridização dos iniciadores, e a síntese ou extensão da fita complementar, finalizando com um ciclo de 8 minutos a uma temperatura de 72°C para a extensão.

O produto amplificado foi analisado num gel de agarose 2,0% com brometo de etídio (na seguinte diluição: 350 ml de H₂O de osmose, 7,2g de agarose e 4µl de brometo de etídio) e registrado por um sistema de captação de imagem e visualizado com luz ultravioleta. Padrões de bandas foram avaliados visualmente e sob um código numérico, sem haver nenhum conhecimento dos resultados de sorotipagem ou dados epidemiológicos.

Resistência aos antimicrobianos

As culturas bacterianas foram semeadas em Agar Muller Hinton¹⁰, incubadas por 24 h e testadas pela técnica de disco-difusão (6) frente aos seguintes princípios ativos: Amoxicilina; Ampicilina; Ciprofloxacina; Enrofloxacin; Florfenicol; Norfloxacina; Penicilina; Tetraciclina e Tilimicosina.

Para tanto, as *P. multocida* em colônias puras foram incubadas em caldo BHI1a 36 ±1°C

por 16 a 18 h. Uma suspensão equivalente a escala 0,5 de MacFarland4 foi obtida por diluição em caldo BHI1 e utilizada para inoculação das bactérias-teste em Agar MuellerHinton10.

Após incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 18 h foi realizada a leitura e interpretação dos halos de inibição conforme tabela específica. Utilizou-se o critério para multirresistência aos fármacos do National Antimicrobial Resistance Monitoring System (11) que cita multirresistência como a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos e também por fenótipos específicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na visualização das trinta e seis (36) reações de PCR, numerada e ordenada de acordo com o sorotipo capsular A e D, de 3 em 3 por estado do país, observamos a migração das bandas na eletroforese.

Na Figura 1 observamos amostras de *P. multocida* A, em que coletas de SC (colunas 01, 02 e 03) apresentaram 3 perfil (P1; P2 e P3). Observou-se que a amostra P1 apresentou banda inicial na faixa 4,0 kb seguindo para 2,0 kb, 1,0 kb diluindo até 200 pb. Já o P2 apresentou bandas com 4,0 kb, 1,0 kb e 200 pb. O P3 iniciou sua banda em 1,0 kb, 750 pb, 500 pb, 250 pb e 200 pb. (Tabela 04). Para o estado de Minas Gerais (colunas 04, 05 e 06), observou-se três perfis distintos, sendo dois perfis também foram observados no estado de SC (P2 e P3) e P4 que iniciou a banda em 1,5 kb e continuando corrida até de 200 pb. Para amostras do Rio Grande do Sul (07, 08 e 09), observou-se perfis idênticos com o estado de SC (P1 e P3) e um perfil novo P5 iniciando banda em 3,0 kb, 2,5 kb e 1,5 kb e finalizando com 300 e 200pb. Resultado semelhante observado para as amostras do Paraná, com dois perfis idênticos aos de SC (P1 e P2) e um perfil distinto P6 com uma banda forte nos 3,0 kb até 750 pb e outra aos 200 pb no final (Tabela 04). As amostras da região SUD, (13, 14 e 15) observou-se três perfis diferentes, sendo P7 com banda inicial em 3,0 kb, 2,0 kb, 1,0 kb, 750 pb, 500 pb, 250 pb e 200 pb. O P8 inicia com banda em 3,0 kb depois no meio com 1,0 kb, 750 pb, 500 pb, 250 pb e 200 pb. Já o P9 inicia em 2,0 kb, 1,0 kb no meio 750 pb e no final da corrida em 200 pb (Tabela 04). Os perfis observado na região Centro Oeste, foram idênticos ao P7 observado na região SUD.

De modo geral os perfis observado no estado de SC, foram observados também nos estados de MG, RS e PR. Já a região SUD apresentou três perfis distintos, sendo o P7 também observado na região Centro-Oeste (MS, MT e GO). Porém para a maioria dos estados observamos diferenças na migrações sugerindo uma diversidade acentuada, com heterogeneidade genética entre cepas e com estirpes de perfis diferentes observados nestes estados do Brasil, conforme Figura 03.

Na segunda fotografia, temos amostras de *P. multocida* D, em que foi observado 8 perfis de bandas distribuídas pelos estados e/ou regiões. Nas colunas 19, 20 e 21 coletas em SC (Figura 04), observamos dois perfis P1 com uma banda muito forte no início com 2,0 kb, depois em 1,0 kb e com corrida até 200pb. Já o P2 iniciou em 2,0 kb depois em 750 pb com corrida até 200 pb (Tabela 05). Para MG, observamos dois perfis também P3 e P4, sendo que P3 inicia banda em 4,0 kb, 2,5 kb, 2,0 kb, 1,5 kb, 1,0 kb e finalizando em 250pb. Já para o P4 a banda iniciou em 2,0 kb, 1,0 kb com corrida até 200 pb. Para amostras do Rio Grande do Sul (números 25, 26 e 27) observou-se diferenças muito significativas entre as 3 amostras com três perfis distintos (P4, P5 e P6), sendo que o P4 também observado no estado de MG. Já o P5 iniciou a banda com 2,5 kb, 250 pb e final da corrida em 200 pb. Para o P6 iniciou em 1,0 kb com corrida até 200 pb (Tabela 05).Paraná, apresentou três perfis distintos sendo que P2 e P4 também observados nos estados de SC e MG. Apresentando um perfil novo P7 iniciando banda aos 2,0 kb e 250 pb. Das amostras da região SUD, números 31, 32 e 33 observou-se dois perfis sendo P4 também observado em MG e P8 com banda bem mais forte na porção média da coluna 2,0 kb, 1,0 kb e finalizando com 200 pb. A região Centro Oeste apresentou somente um perfil P4 também observado no estado de MG e SUD.

Portanto, para amostras de *P. multocida* D selecionadas de SC e PR verificamos similaridade entre padrão de bandas indicando uma proximidade entre amostras com o perfil P2 observada em ambos os estados. Já para a região de MG, RS, PR, SUD e região Centro Oeste verificamos que o perfil P4 foram incomum para todas os estados, com destaque para a região Centro-oeste apresentando somente um perfil P4.

De modo geral a distribuição e prevalência de cepas multirresistentes de *P. multocida* de suínos e a associação destas cepas com doenças graves sugerem que mais atenção deve ser dada para a utilização prudente de agentes antimicrobianos e à vacinação (11). Surtos territoriais de infecções respiratórias podem variar consideravelmente de região para região e ao longo do tempo em uma determinada região.

Analisando a suscetibilidade antimicrobiana das amostras de *P. multocida* A e *P. multocida* D em relação aos principais antibióticos, observamos que a frequência altera-se consideravelmente

dependendo da amostra de *P. multocida* em que observamos respostas diferentes ao tratamento com antibióticos (Tabela 06).

A Amoxicilina apresentou para a *P. multocida* A uma sensibilidade de 88,9% em relação ao antibiótico e de 100% para *P. multocida* D. Já para a Ampicilina observamos que a *P. multocida* A apresentou 77,8% e para a Past. D o percentual foi de 88,9% de sensibilidade.

A Ciprofloxacina apresentou baixos percentuais de sensibilidade com apenas 44,4% na *P. multocida* A e de 50% para a *P. multocida* D. Sendo que apresentou um percentual intermediário de 38,9% e 27,8%, e uma resistência considerável de 16,7% e 22,2% para *P. multocida* A e D, respectivamente.

Resultado similar observado para o Enrofloxacin com percentuais de 44,4% e 38,9% de sensibilidade para *P. multocida* A e D, sensibilidade parcial de 27,8% e 33,3% e resistência de 27,8% para ambas as *P. multocida*. (Tabela 06).

Para Florfenicol observamos uma acentuada eficiência entre as *P. multocida*, sendo que a *P. multocida* A foi sensível a 94,4% e a *P. multocida* D com percentuais de 50% em relação ao antibiótico utilizado. Porém não apresentou resistência para nenhuma das cepas, somente sensibilidade parcial com percentuais de 5,6% e 50% para ambas as cepas (Tabela 07).

A *P. multocida* D mostrou-se ser mais sensível em relação a Norfloxacin com percentual de 66,7% e para a Past. A 55,6%. Ambas as cepas responderam com 22,2% de sensibilidade parcial e com resistência de 22,2% para *P. multocida* A e de 11,1% para a *P. multocida* D.

A Penicilina obteve uma frequência para a sensibilidade da *P. multocida* A e D de 50% e 55,6% e de 44,4% e 55,6% de sensibilidade parcial, respectivamente. Somente a *P. multocida* A apresentou um resistência de 5,6 em relação ao uso da penicilina (Tabela 07).

Para a Tetraciclina a *P. multocida* A mostrou-se ser mais sensível com percentuais de 61,1%, 27,8% de sensibilidade parcial e de 11,11% resistente. Já a *P. multocida* D apresentou um percentual muito baixo com apenas 38,9% de sensibilidade, 27,8% de sensibilidade parcial e com 33,3% de resistência (Tabela 06).

Por sua vez o Tilmicosina mostrou-se ser o mais eficiente em relação a *P. multocida* A com 100% de sensibilidade e a *P. multocida* D com 94,4%. Porém a *P. multocida* D apresentou um baixo percentual de resistência com 5,6% (Tabela 06).

Analisando a frequência da sensibilidade antimicrobiana por perfil observamos que o percentual de sensibilidade e resistência dependendo da sorologia e o perfil (Tabela 07 e 08). A Amoxicilina apresentou excelente percentuais para quase todas os perfis com 100% de sensibilidade para ambas as *P. multocida*, somente o perfil de P1 e P2 apresentaram percentual de resistência somente para a Past. A com 33,3% de resistência bacteriana (tabela 04 e 05) Resultado similar observado para a Ampicilina com excelente percentuais de sensibilidade exceto para P1 e P2, sendo que P1 apresentou resistência de 33,3 para *P. multocida* A e D, e o P2 apresentou resistência a *P. multocida* D (50,0%).

Já para Ciprofloxacina e Enrofloxacin apresentaram percentuais elevados para a resistência da bacteriana em quase todos os perfis. Somente o perfil P5 para o isolado *P. multocida* A e P7 para a *P. multocida* D apresentaram uma eficácia de 100% (tabela 07 e Tabela 08).

De outro lado o Florfenicol apresentou percentuais excelentes para a sensibilidade antimicrobiana para todos os estados, com 100% de sensibilidade para quase todas as regiões, somente P2 apresentou 66,7% de Sensibilidade para ambas as *P. multocida* A e D, porém não apresentou percentuais de resistência.

O Norfloxacin apresentou 100% de sensibilidade para a *P. multocida* A e D para todos os perfis, somente o P3 apresentou resistência elevada de 66,7% e 50% para *P. multocida* A e D, respectivamente.

Para a Penicilina observamos resultados satisfatório de sensibilidade somente para os perfis P5, P6 e P9 na *P. multocida* A. Para a *P. multocida* D apresentou 100% de sensibilidade somente para o perfil P2, P5 e P7.

O antibiótico Tetraciclina apresentou um percentual de resistência principalmente para os perfis P1, P2 e P7 para a *P. multocida* A, porém apresentou excelente percentuais de sensibilidade para os perfis P5 e P7 para a *P. multocida*. D, com 100% de sensibilidade.

Por último o Tilmicosina com percentuais de 100% de sensibilidade da *P. multocida* A para todos os perfis. Apenas a *P. multocida* D para o perfil P2 apresentou 50% de resistência da atividade microbiana.

De modo geral todas as amostras de *P. multocida* apresentaram alguma sensibilidade em relação aos antibióticos Amoxicilina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Enrofloxacin, Enrofloxacin, Florfenicol, Norfloxacin, Penicilina, Tetraciclina e Tilmicosina.

Porém, no ranqueamento distinto em relação ao teste de sensibilidade microbiana das

amostras de *P. multocida* A e D. A *P. multocida* A obteve ranqueamento ordenado por: Tilmicosina, Florfenicol, Amoxicilina, Ampicilina, Tetraciclina, Norfloxacin, Penicilina, Ciprofloxacina e Enrofloxacin. Já para as *P. multocida* D o ranqueamento foi ordenado por: Amoxicilina, Tilmicosina, Ampicilina, Norfloxacin, Ciprofloxacina, Florfenicol, Penicilina, Enrofloxacin e Tetraciclina. De modo geral Tilmicosina e Amoxicilina apresentaram melhores resultados, indicando uma opção mais assertiva no tratamento da *P. multocida* para ambas.

Em relação a eficiência dos antibióticos por regiões observamos que os estado de SC, RS e principalmente o estado de PR, obtiveram considerável percentuais de resistência seja pela *P. multocida* A e/ou D. Provavelmente tal fato deve ativer da criação extensiva de décadas, utilizando-se basicamente os mesmo princípios de tratamento.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho são indicativos de alta disparidade entre perfis de *P. multocida* no território brasileiro, existindo significativa diversidade genética entre cepas de *P. multocida* A e *P. multocida* D e mesmo dentro do mesmo tipo capsular, à nível de estado e entre estados do Brasil, o que proporciona sensibilidades distintas entre os antibióticos. A priori o presente estudo traz informações capaz de nortear as medidas emergências, porém ainda seria recomendável a coleta de materiais e análise bacteriana, para que se permita um decisão correta sobre qual estratégia a ser adotada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Holt H, Alarcon P, Velasova M, Pfeiffer D, Wieland B,. BPEX Pig Health Scheme: a useful monitoring system for respiratory disease control in pig farms? **BMC Vet. Res.** 2011. **2**. Merialdi G, et al., Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. **Vet. J.** 234–239, 2012. **3**. Augustijn M, et al., The etiology of chronic pleuritis in pigs: a clinical, pathological and serological study. Proceedings of the 20th Congress of the International Pig **Veterinary Society**, Durban. OR.05.12. 2008. **4**. Cleveland-Nielse, A, Nielsen, EO, Ersboll AK,. Chonic pleuritis in Danish slaughter pig herds. **Preventive Veterinary Medicine.** v.55, p. 121-135, 2002. **5**. Morés, M.A.Z. Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaça em suínos. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. **6**. Morés MAS, Oliveira Filho JX, Rebelatto R, Bellaver FAV, Ianiski, Kleinc S, Barcellos DEN, Morés N. Complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS) no Brasil: anatomopatologia e microbiologia de casos clínicos. In., 2013, Cuiabá. **Anais...** de palestras e resumos. Cuiabá: Abraves, 2013. **7**. Oliveira JX. Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos, **Dissertação** (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2014. **8**. Straw B.et. al. Prevalence of lesions in the pars esophagea of normal and sick pigs. **Proc. International Pig Society Congress.** Hague, Netherlands, p.386. 1992; **9**. Zanella, R. *et al.* Unravelling the genetic components involved in the immune response of pigs vaccinated against influenza virus. **Virus Research** v. 210, p. 327-336, 2015. **10**. Versalovic et al, Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction, **Methods in Molecular and Cellular Biology** v.5, p. 25-45 Michigan USA. 1994. **11**.Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q & Chen H. Isolation, antimicrobial resistance and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. **Journal of Clinical Microbiology** 47, 951-958. 2009.

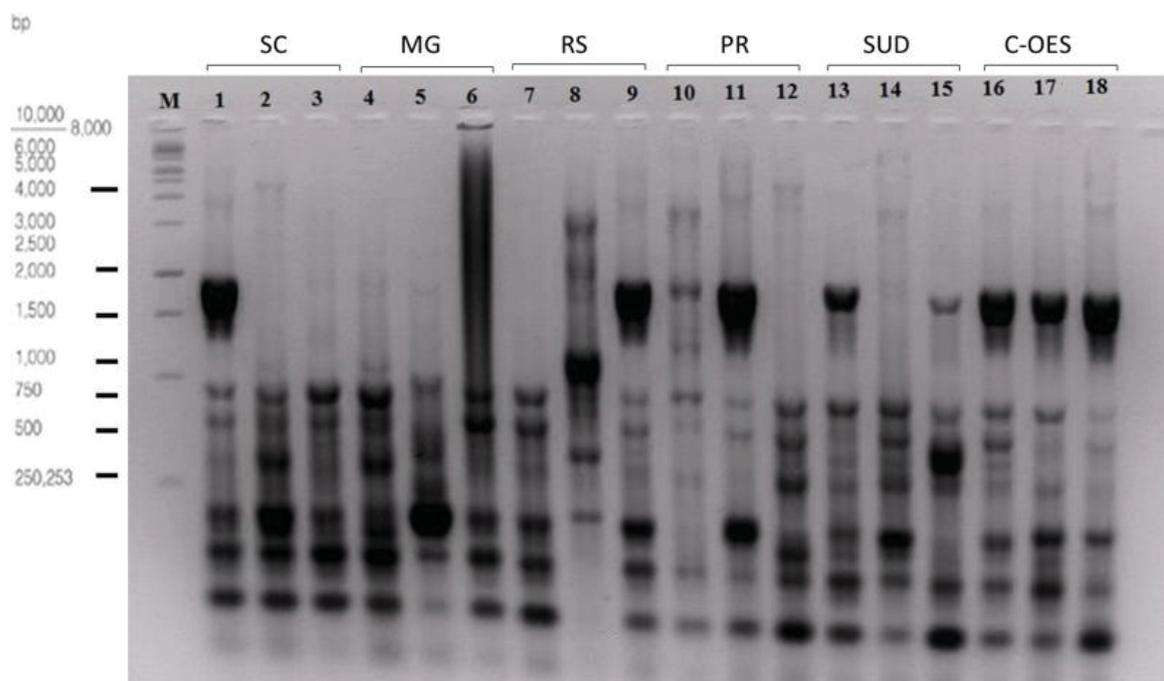


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. Produto da amplificação do DNA de *P. multocida* A. Canaletas “M” do marcador λ leader 1kb, nas 1, 2 e 3 são de Santa Catarina; 4, 5 e 6 de Minas Gerais; 7, 8 e 9 do Rio Grande do Sul; 10, 11 e 12 do Paraná; 13, 14 e 15 dos estados de São Paulo e Espírito Santo; 16, 17 e 18 dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.

Tabela 4. Dados referentes à investigação epidemiológica para pesquisa de *P. multocida*, A em diferentes Estados - Brasil, 2013/2014.

Bp	SC ^{NS}			MG ^{NS}			RS ^{NS}			PR ^{NS}			SUD ^{NS}			C-OE*		
4,0 Kb	X	X		X				X		X	X					X	X	X
3,0 KB							X			X			X	X		X	X	X
2,5 kb							X											
2,0 kb	X						X	X		X	X		X		X	X	X	X
1,5 KB				X			X			X								
1,0 kb	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
750 pb	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
500 pb	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X
250 pb	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X
< 200 pb	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Perfil	P1	P2	P3	P2	P4	P3	P3	P5	P1	P6	P1	P2	P7	P8	P9	P7	P7	P7

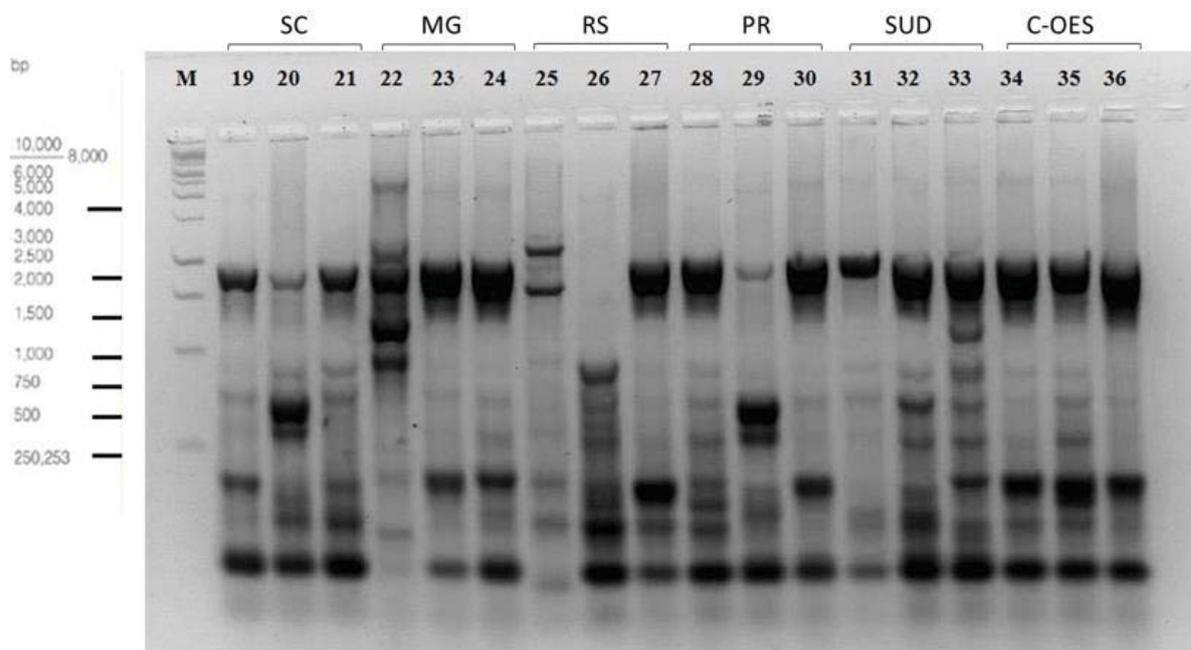


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio. Produto da amplificação do DNA de *P. multocida* D. Canaletas "M" do marcador λ leader 1kb, nas 19, 20 e 21 são de Santa Catarina; 22, 23 e 24 de Minas Gerais; 25, 26 e 27 do Rio Grande do Sul; 28, 29 e 30 do Paraná; 31, 32 e 33 dos estados de São Paulo e Espírito Santo; 34, 35 e 36 dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás.

Tabela 5. Dados referentes à investigação epidemiológica para pesquisa de *P. multocida*, D em diferentes Estados - Brasil, 2013/2014.

Bp	SC ^{NS}			MG ^{NS}			RS ^{NS}			PR ^{NS}			SUD ^{NS}			C-OE*		
4,0 Kb				X														
3,0 KB																		
2,5 kb				X			X											
2,0 kb	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
1,5 KB				X														
1,0 kb	X		X	X	X	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X
750 pb	X	X	X		X	X		X	X	X	X			X	X	X	X	X
500 pb	X	X	X		X	X		X	X	X	X			X	X	X	X	X
250 pb	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
< 200 pb	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Perfil	P1	P2	P1	P3	P4	P4	P5	P6	P4	P4	P2	P7	P8	P4	P4	P4	P4	P4

Ns = não significativo; * P0,05

Tabela 6. Tabela de frequência da sensibilidade antimicrobiana de 36 amostras de *P. multocida*

Antibióticos	-----Past. A-----			-----Past. D-----		
	S	P/S	R	S	P/S	R
	-----%-----					
Amoxicilina	88,9	-	11,1	100	-	-
Ampicilina	77,8	5,6	16,7	88,9	5,6	5,6
Ciprofloxacina	44,4	38,9	16,7	50	27,8	22,2
Enrofloxacina	44,4	27,8	27,8	38,9	33,3	27,8
Florfenicol	94,4	5,6	-	50	50	-
Norfloxacina	55,6	22,2	22,2	66,7	22,2	11,1
Penicilina	50	44,4	5,6	44,4	55,6	-
Tetraciclina	61,1	27,8	11,1	38,9	27,8	33,3
Tilmicosina	100	-	-	94,4	-	5,6

Tabela 7. Frequência da sensibilidade antimicrobiana de *P. multocida* A por perfil, A¹ - Amoxicilina; A² - Ampicilina; C³ - Ciprofloxacina; E⁴ - Enrofloxacina; F⁵ - Florfenicol; N⁶ - Norfloxacina; P⁷ - Penicilina; T⁸ - Tetraciclina; T⁹ - Tilmicosina.

Perfil	A/B	A1	A2	C3	E4	F5	N6	P7	T8	T9
-----%-----										
P1	S	66,7	33,3	66,7	66,7	100	66,7	0	66,7	100
	P/S	0	33,3	33,3	0	0	33,3	66,7	33,3	0
	R	33,3	33,3	0	33,3	0	0	33,3	0	0
P2	S	66,7	33,3	33,3	33,3	66,7	33,3	66,7	33,7	100
	P/S	0	0	33,3	0	33,3	66,7	33,3	66,7	0
	R	33,3	66,7	33,3	66,7	0	0	0	0	0
P3	S	100	100	66,7	66,7	100	33,3	66,7	100	100
	P/S	0	0	33,3	0	0	0	33,3	0	0
	R	0	0	0	33,7	0	66,7	0	0	0
P4	S	100	100	0	0	100	0	100	100	100
	P/S	0	0	100	100	0	100	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P5	S	100	100	100	100	100	0	100	100	100
	P/S	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P6	S	100	100	0	0	100	0	100	0	100
	P/S	0	0	100	100	0	100	0	100	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P7	S	100	100	50	50	100	0	25	50	100
	P/S	0	0	25	25	0	75	75	25	0
	R	0	0	25	25	0	25	0	25	0
P8	S	100	100	0	0	100	100	100	100	100
	P/S	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P9	S	100	100	0	0	100	100	100	0	100
	P/S	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	R	0	0	33,3	0	0	0	0	100	0

S=Senbilidade; P/S = Parcialmente sensível; R= Resistente

Tabela 8. Frequência da sensibilidade antimicrobiana de *P. multocida* D por perfil, A¹ - Amoxicilina; A² - Ampicilina; C³ - Ciprofloxacina; E⁴ - Enrofloxacina; F⁵ - Florfenicol; N⁶ - Norfloxacina; P⁷ - Penicilina; T⁸ - Tetraciclina; T⁹ – Tilmicosina.

Perfil	AB	A1	A2	C3	E4	F5	N6	P7	T8	T9
-----%-----										
P1	S	100	100	100	100	100	100	0	100	0
	P/S	0	0	0	0	0	0	100	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	100
P2	S	100	50	0	0	50	0	0	0	50
	P/S	0	0	100	50	0	100	100	50	0
	R	0	50	0	50	50	0	0	50	50
P3	S	100	100	50	50	100	50	50	50	100
	P/S	0	0	0	0	0	0	50	0	0
	R	0	0	50	50	0	50	0	50	0
P4	S	100	88,9	44,4	33,3	100	66,7	56,4	33,3	100
	P/S	0	11,1	33,3	44,4	0	22,2	44,4	33,3	0
	R	0	0	22,2	22,2	0	11,1	0	33,4	0
P5	S	100	100	100	0	100	100	100	100	100
	P/S	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P6	S	100	100	0	0	100	100	0	0	100
	P/S	0	0	100	0	0	0	100	100	0
	R	0	0	0	100	0	0	0	0	0
P7	S	100	100	100	100	100	100	100	0	100
	P/S	0	0	0	0	0	0	0	100	0
	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S=Sensibilidade; P/S = Parcialmente sensível; R= Resistente.

5. CONCLUSÕES

A suinocultura é uma atividade importante no Brasil e a ampliação de plantéis está levando a um aumento populacional em uma mesma área, com detrimento na questão sanitária, levando a um aumento das infecções latentes bacterianas, e nesse contexto, uma das lesões que levam a um aumento de morbimortalidade é a pleurisia. Após a análise dos agentes causadores desta lesão pode-se concluir que:

a) Das pleurisias no Brasil, a *P. multocida* e o HPS são os mais prevalentes, em que juntos representam 86% (31% e 55%) do total.

b) *P. multocida* teve maior prevalência na região Sudeste (SP, RJ, ES). Para a região do Centro-Oeste (MS, MT e GO) a *P. multocida* prevaleceu de forma semelhante ao HPS. Já para os estados do PR, SC e MG o HPS teve maior ocorrência.

c) Estratificando por idade, obtivemos os mesmos resultados da bibliografia, com o HPS prevalecendo na fase creche, a *P. multocida* e APP na fase de crescimento e terminação e o *S. suis* e BB independente da fase.

d) *P. multocida* tem maior importância econômica devido a prevalência e a persistência da lesão até o momento do abate, diminuindo o valor da carcaça;

e) Existe uma alta disparidade de cepas de *P. multocida* no Brasil, tanto entre a *P. multocida* A e *P. multocida* D, dentro do mesmo tipo capsular, entre os estados e nas diferentes granjas dentro do mesmo estado.

f) A *P. multocida* A e *P. multocida* D apresentaram diferentes sensibilidades a antibióticos, com maior sensibilidade a amoxicilina, ampicilina, florfenicol e a tilmicosina e maiores índices de resistência a ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, tetraciclina e penicilina.

g) SC, RS e principalmente o estado de PR, apresentaram consideráveis percentuais de resistência seja pela *P. multocida* A e/ou *P. multocida* D.

h) Estes resultados dão indicativo de que na ocorrência de surtos ou alta incidência de lesões no frigorífico, que se avalie os lotes coletando o material e fazendo uma análise bacteriana para se tomar medidas profiláticas e curativas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pleurisia é uma lesão localizada nos pulmão e pleura de suínos, tendo importância pois animais afetados que são destinados ao abate requerem uma limpeza da carcaça removendo a membrana pleural inflamada da cavidade torácica, muitas vezes tendo de remover parte considerável da carcaça. Isto implica em perdas de processo tanto em tempo na linha de abate, como no comprometimento da carcaça para o produtor e para o frigorífico.

A infecção inicial se localiza na pleura visceral junto a superfície do pulmão, mas por extensão pode ter envolvimento da pleura parietal e até mesmo tornar-se generalizada. O aspecto da lesão no pulmão é de uma superfície rugosa e em casos graves, com aderência fibrosa na superfície podendo estender-se a pleura, com aderência entre os lobos pulmonares deixando uma aderência firme e extensa entre o pulmão e a costela.

Neste trabalho, analisamos 10,63% (482 de 4536) dos exames laboratoriais, colhidos de diversos estados do Brasil, que apresentem lesão de pleurisia ao exame anatomopatológico e bacteriológico. Foram estratificados por idade, por localizações geográficas e agentes bacterianos envolvidas. Devido a prevalência, idade de atingimento e importância econômica, optamos por caracterizar a *P. multocida*, observando a sua diversidade genética no território brasileiro.

Como resultados, verificamos que o HPS tem maior prevalência em fase de creche dos 30 aos 70 dias de idade. Que a *P. multocida* tem maior prevalência na fase de crescimento dos 80 aos 120 dias, o APP mais tardio, na terminação, sendo estes, mais importante economicamente pois não dá tempo para a regressão de lesões na pleura, impactando em carcaças com pleurisia no abate.

Verificamos que exames com identificação de HPS tiveram maior prevalência em estados do sul do Brasil, devido à alta densidade populacional e mobilidade de rebanhos suínos no estado e interestadual, bem como pelo clima mais frio e com altas variações de temperatura. Nos estados do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, com clima mais quente, observamos que a *P. multocida* tem incidência igual ou superior ao HPS.

A alta disparidade entre sorologias de *P. multocida* no território brasileiro (9 perfis para a *P. multocida* A e 8 perfis da *P. multocida* D), com sensibilidades distintas entre os antibióticos (amoxicilina, ampicilina, florfenicol e tilmicosina). Entretanto a priori o presente estudo traz informações capazes de nortear as medidas emergências, porém ainda seria recomendável a coleta de materiais e análise bacteriana, para que se permita uma decisão correta sobre qual estratégia a ser adotada.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **Associação Brasileira de Proteína Animal – ABRA. Relatório Anual da Proteína Animal.** Brasília (DF); 2015. Disponível: http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf
2. **DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos – DEPEC.** Carne Suína, 2016. Disponível: http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_carne_suina.pdf
3. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.** Relatório anual. Brasília (DF); 2015.
4. **BRASIL.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. PORTARIA Nº 914, de 12 de setembro de 2014. (nº 177, Seção 1, pág. 4).
5. **Cleveland-Nielsen, A.; Nielsen, E.O.; Ersboll, A.K.** Chronic pleuritis in Danish slaughter pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 55, p. 121-135, 2002
6. **Morés, M A S.** Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 91p 2006.
7. **Morés, Nelson et al.** Produção de suínos em família, sem uso preventivo de antimicrobiano e privilegiando o bem-estar animal. *Concórdia, Embrapa Suínos e Aves, Sistema de Produção/Embrapa Suínos e Aves*, ISSN 1678-8850, 2013.114
8. **Zanella, R. et al.** Unravelling the genetic components involved in the immune response of pigs vaccinated against influenza virus. *Virus Research* v. 210, p. 327-336, 2015.
9. **Moreno, A. M.** Caracterização fenotípica e genotípica e isolados de *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida* de suínos provenientes de diferentes regiões do Brasil. 2002. 78p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
10. **Oliveira Filho J.X.** Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos. *Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 124p. 2014.
11. **Young b e heath j,** Sistema respiratório. In: *Weather Histologia Funcional* (Quarta Edição), pp 222 – 236. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
12. **Lopez A,** Sistema Respiratório. In: Carlon WW, Macgavin MD, (Eds.) *Patologia veterinária especial de Thomson*. 2a ed. Porto Alegre: Artmed, 1998, cap. 3 p.132-193.

13. **Light et al**, Pleural effusion: the diagnostic separation of transudates and exsudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-513.
14. **Tucker, D.** Pleurésie: impact économique et stratégies de conduite. 2013
15. **Sobestiansky, J. Barcellos, D.; Morés, N.; Carvalho, L.F.; Oliveira, S.** Clínica e patologia suína. 2. ed. Goiânia: Art 3, 1999. 464 p.
16. **Chiers, K.; Donné, E.; Overbeke, I.V.; Ducatelle, R.; Haesebrouch, F.** Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, v. 88, p.385-392, 2002.
17. **Higgins, R.; Gottschalk, M.**, Streptococcal Diseases. In: STRAW, B. E. et al. (Eds.). *Diseases of swine*. 8th Ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. cap.41 p. 563-78.
18. **Morés M.A.Z., Kuchiishi S.S., Ascoli K.R. & Morés N.**, Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. Anais 15º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Fortaleza, CE. CD-ROM.
19. **Straw B., Henry S., Nelssen J., Doster A., Moxley R., Rogers D., Webb D. & Hogg A.** Prevalence of lesions in the pars esophagea of normal and sick pigs. *Proc. International Pig Society Congress*. Hague, Netherlands, p.386. 1992
20. **Pijoan, C.** Pneumonic Pasteurellosis. In: STRAW, B.E. et al. (Eds.). *Diseases of swine*. 8th Ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. cap. 37. p. 511-520.
21. **Roberts, I.S.,** The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Micro-biol.* 50, 1996. 285–315
22. **Alwis, M.C.L.** Pasteurellosis in Production Animals: A Review. In: *Pasteurellosis in Production Animals*, ACIAR Proceedings n. 43. Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B., Hoffman, D.; Lehane, L. (Eds.). ACIAR, Bali, Indonésia, 1992.p. 11–18.
23. **Nagai, S., Someno, S., Yagilhashi, T.** Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, v.32p.1004-1010.
24. **Linchtensteiger, C. A., Steenbergen, S. M., Lee, R. M., Polson, D. D., Vimr, E. R.** Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *Jornal of Clinical Microbiology*, 1996, v.34 p.3035-3039.

25. **Pijoan, C.** Pneumonic pasteurelosis In: Leman, A. D.: Mengeling, W. L., D'allaire, S.; Taylor, D. J. (Ed). Disease of swine. 7. Ed. Ames: Iowa University Press, 1992.p. 552-559.
26. **Pijoan, C. Fuentes M,** Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine. *J Am Vet Med Assoc* v.191, 1987. p.823-826.
27. **Boyce JD, Harper M, Wilkie IW & Adler B.** *Pasteurella*, In: Prescott J.F. (Ed.), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4th ed. Blackwell Publishing, Ames. 2010 p.325-340.
28. **May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S. & Kapur,** Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. V. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** , 3460–3465
29. **Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kiebling S., Filter M. & Wieler LH.** Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.* 2006. 114:304-317.
30. **Snipes KP, Ghazikhanian GY, Hirsh DC,** Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of na encapsulated, virulent strain with its avirulent, asapsular variant. *Avian Diseases*, v. 31, 1986. p.254-259.
31. **Harper M., Boyce J.D. & Adler B.** Minireview *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. 265:1-10.
32. **Duguid JP, Anderson ES, Campbell I,** Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 92, 1966. p. 107-138.
33. **Fuller TE, Kennedy MJ & Lowery DE.** Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microbiol. Pathogens*, 2000.29:25-38.
34. **Rimler RB, Rhoades KR,** *Pasteurella multocida*. In: Adlam C, Rutter JM. (Ed.) *Pasteurella e Pasteurellosis*. London: Academic Press, 1989. p.85-113.
35. **Mullan PB, Lax AJ,** *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoclasts via interaction with osteoblasts. *Calcified Tissue International*, v. 63, 1998. p.304-345.
36. **Gray-Owen SD, Schryvers AB,** Characterization of transferrin binding proteins 1 and 2 in invasive type b and nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, v. 63, 1995. p. 3809-3815.

- 37. Dabo S M, Confer A W, Quijano-Blas R,** A molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis*, v.35,9147-157.2003.
- 38. Carpentier B.** Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiology*. 14(1): 31-37. 1997
- 39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second information supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA. 2012.
- 40. Santana ES, Oliveira FH, Barnabé ACS, Mendes FR, Andrade MA.** Uso De Antibióticos e Quimioterápicos na Avicultura 2012.
- 41. Bosch M, Garrido E, Liagostera M, Rozas AMP, Badiola I, Barbé J,** *Pasteurella multocida* *exB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiology Letters*, v. 210, 2002. p.201-208.