

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA -
UDESC CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JULIANA LAZAROTO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO DE VACINA
CONTRA *Pasteurella multocida* SOROTIPO A EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agroveterinárias, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dr.^a Sandra Davi Traverso
Coorientador: Dr. José Cristani

**LAGES
2015**

L431d

Lazaroto, Juliana

Desenvolvimento de protótipo de vacina contra
Pasteurella multocida sorotipo A em suínos /
Juliana Lazaroto. - Lages, 2015.

81 p.: il.; 21 cm

Orientadora: Sandra Davi Traverso

Coorientador: José Cristani

Bibliografia: p. 70-81

Dissertação (mestrado) - Universidade do
Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2015.

1. Bacterina. 2. Adjuvante. 3.
Imunogenicidade.
I. Lazaroto, Juliana. II. Traverso, Sandra Davi.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV.
Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/ UDESC

JULIANA LAZAROTO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPO DE VACINA CONTRA
Pasteurella multocida SOROTIPO A EM SUÍNOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agroveterinárias, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca examinadora:

Orientadora:

Prof.^a Dra. Sandra Davi Traverso
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Pesquisador Dr. Luizinho Caron
Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Membro:

Prof. Dr. Aldo Gava
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 23/07/2015

Dedico aos meus pais e a minha
irmã pelo apoio nesta etapa.
Obrigado pelos seus
ensinamentos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à toda minha família, especialmente meus pais, *Vilma Maria Lazaroto e Ivanir Lazaroto*, por sempre terem me apoiado durante estes 2 anos, fazendo com que isso se tornasse possível. A minha irmã, *Adriana*, pelo apoio, pelas conversas e pela grande amizade. Essa conquista não é somente minha, é nossa!

À minha orientadora professora *Dra. Sandra Davi Traverso*, e meu co-orientador professor *Dr. José Cristani*, pela orientação, conselhos, amizade e ensinamentos, enfim, pela oportunidade da realização do mestrado, foram muito importantes para mim nesta etapa.

A Embrapa Suínos e Aves, pela oportunidade de realização do projeto, agradeço a toda a equipe. Ao *Nelson Mores* que sempre este presente e a disposição para conversar e passar novos ensinamentos, ao *Luizinho Caron* sempre muito empolgado com os resultados e cheio de novas ideias.

Aos meninos do isolamento e da necropsia, *Dejalmo e Altair* que sempre estavam a disposição para ajudar, e sempre havia uma historia ou uma piada para contar. Ao *Erno e Jair* responsáveis pelo SPF.

A *Francilele e a Kelen* que foram ótimas companhias no laboratório de patologia, não esquecendo, do laboratório de bacteriologia, a *Raquel e a Franciana* que acompanharam cada mudança e etapa do projeto, à estagiaria *Emanueli*. Da bac levo ainda a grande amizade da *Fran* que continua presente em todos os momentos, com muitas rizadas e conversas.

Aos demais que me auxiliaram, a *Cintia, João, Dani Gava, Catia* sempre estiveram a disposição. Ao *Valter* que sempre conseguia o artigo, obrigada pela amizade, que o chá e o chocolate nunca falem na sua sala.

Ao *Arlei*, o mestre em estatística, muito obrigada pela ajuda e explicações.

Agradeço em especial ao *Marcos Mores*, que sempre estava presente, ajudando não só parte pratica, mas sempre me

ouvindo, seja na hora do almoço ou no laboratório, e com muita paciência ai lá e tudo se resolvia. Agradeço pelos ensinamentos e amizade.

As meninas da republica, *Aline, Talita e Lina Mariaa*, que foram ótimas companhias para uma cerveja, uma conversa na sacada e com certeza muitas rizadas.

Aos amigos que se mantiveram da graduação e os novos que surgiram *Francini, Leilinha, Carol, Frenando, Monica Marcela, Jonathan, Wagner* que me apoiaram durante essa jornada e que traziam consigo boas palavras.

Ao meu namorado *Élvio Secco* que esteve sempre ao meu lado, me incentivando, aturando meu bom humor instável a cada dia. Obrigada pelo companheirismo e amizade de todos os dias.

Aos demais que eu possa ter esquecido, muito obrigado.

À Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV pela oportunidade da realização do mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina – FAPESC, pela concessão da bolsa de mestrado.

A TODOS, MUITO OBRIGADO!

“Confie em si mesmo. Crie o tipo de vida que você gostaria de levar a vida inteira. Tire o máximo de si atizando aquelas pequenas centelhas interiores de possibilidades as transformando no fogo da realização”.

Foster C. McClellan

RESUMO

LAZAROTO, Juliana. **Desenvolvimento de protótipo de vacina contra *Pasteurella multocida* sorotipo A em suínos**. 2015. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

Por muito tempo, *Pasteurella multocida* foi considerada apenas como agente secundário nas pneumonias em suínos, todavia, estudos realizados no Brasil identificaram diferentes isolados de *P. multocida* capazes de atuar como agente primário de doença em suínos. Esse projeto teve como objetivo estudar aspectos de proteção de uma vacina com amostras patogênicas da *P. multocida* em modelo experimental com suínos de “alto status sanitário”. E de forma paralela descrever expressão da resposta imune dos suínos induzida pela infecção da *P. multocida* e determinar a prevalência dessa bactéria em tonsilas de suínos vacinados e não vacinados através de imunohistoquímica. O trabalho foi dividido em três experimentos: “Imunização de camundongos com vacinas preparadas com diferentes adjuvantes”; “Teste de dois adjuvantes utilizados na vacinação de suínos frente ao desafio com uma cepa homóloga de *P. multocida*”; e “Desafio experimental em suínos com uma cepa de *P. multocida* heteróloga à da vacina”. Em camundongo foram testados quatro adjuvantes: $Al(OH)_3$, ISA 206, Montanide™ GEL 01 e ISA 760, dos quais, foram selecionados dois para teste em suínos: $Al(OH)_3$, que apresentou melhor resultado nos camundongos e ISA 760, por ser um adjuvante oleoso. Embora as duas vacinas tenham sido efetivas na proteção da doença, no segundo experimento, selecionou-se àquela com adjuvante $Al(OH)_3$, que apresentou menor reação vacinal. No terceiro experimento realizado em suínos, foram utilizados 18 suínos

em três grupos: grupo 1 (G1) - vacina com Al(OH)₃, e grupo 2 (G2) – controle de infecção e grupo 3 (G3) controle negativo. Após o experimento os animais foram eutanasiados para avaliação patológica, coleta de amostras em gelo para cultivo microbiológico e quantificação relativa da expressão gênica das citocinas (IL1 β, IL2, TNFα) e TLR4, para histopatologia de rotina e imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que o protótipo de vacina com adjuvante Al(OH)₃ foi eficiente no controle de pasteurelose pulmonar. O perfil da expressão da resposta imune foi mediado por TLR4, com aumento da expressão de TNFα. Também foram expressos IL-1β e IL2, porém sem diferença significativa entre os grupos. A imunomarcagem de *P. multocida* na tonsila foi positiva em todos os suínos desafiados com a bactéria, independente de serem ou não vacinados.

Palavras chaves: Bacterina; Adjuvante; Imunogenicidade.

ABSTRACT

LAZAROTO, Juliana. **Evaluation of inactivated vaccine against *Pasteurella multocida* serotype A in swine.** 2015. 81p. Dissertation (Master of Animal Science – Field: Animal Sanity) – Santa Catarina State University. Postgraduate program in Animal Science, Lages, 2015.

For a long time, *Pasteurella multocida* has been considered only as a secondary agent in pneumonias in swine. However, studies developed in Brazil identified different isolates of *P. multocida* able to operate as primary disease agent in swine. The objective of his project was to study protection aspects of a vaccine with pathogenic samples of *P. multocida* in experimental model with “high sanity status” pigs. In addition, it aims to describe the expression of immune response in swine induced by *P. multocida* infection, and determinate the prevalence of *P. multocida* in tonsils of vaccinated and not vaccinated pigs through immunohistochemistry. The study was divided into three experiments: “Immunization of mice with vaccines prepared with different adjuvants”, “Test of two adjuvants used in vaccine with a *P. multocida* homologous strain in swine” and “Experimental challenge in swine with a *P. multocida* heterologous strain to the vaccine”. Four adjuvants were tested in mice: Al(OH)₃, ISA 206, Montanide™ GEL 01 and ISA 760. Two of them were selected for testing in swine: Al(OH)₃ – which showed better results in mice-, and ISA 760 – for being an oily adjuvant. At the second experiment, although two vaccines have been effective in the disease protection, the one with the adjuvant Al(OH)₃ was selected, because showed lower vaccine reaction. Eighteen pigs were distributed into three groups for the specific test of the vaccine for pathogenic samples of *P. multocida*. Group 1 (G1) – vaccine with Al(OH)₃; group 2 (G2) – infection control; and

group 3 (G3) – negative control. After the experiment, the animals were euthanized, and samples were collected in ice - for microbiological cultivation and relative quantification of cytokines gene expression (IL1 β , IL2, TNF α) and TLR4 –, and in formaldehyde, for routine histopathology and immunohistochemistry. Results showed that the vaccine prototype with adjuvant Al(OH)₃ was efficient in controlling pulmonary pasteurellosis. The immune response was mediated by TLR4, with increased expression of TNF α . IL-1 β and IL2 were also expressed, however, there was no significant difference between the groups. The immunostaining of *P. multocida* in tonsil was positive in all pigs challenged with the bacteria.

Key-words: bacterin; adjuvant; Immunogenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Suíno do grupo controle: Hidrotórax, deposição de fibrina sobre a pleura visceral e consolidação do lobo cardíaco direito, com evidenciação na superfície de corte de exsudato bronquial mucopurulento (seta) e nódulo necrohemorrágico (área circunscrita).	45
Figura 2: Suíno do grupo controle: Hidrotórax, deposição difusa de fibrina sobre a pleura visceral e pericárdio e edema interlobular.	45
Figura 3: Suíno do grupo ISA 760: Granuloma no local da aplicação da vacina (músculo romboide) 42 dias após a vacinação.	46
Figura 4: Suíno do grupo G2 (controle de infecção): nódulo necrohemorrágico no bordo ventral lobo cardíaco.	59
Figura 5: Suíno do grupo G2 (controle de infecção): Linfonodo mediastínico: infiltrado de neutrófilos moderado, multifocal.	62
Figura 6: Suíno do grupo G2 (controle de infecção): Pulmão caracterizado por: necrose de coagulação com infiltrado acentuado de neutrófilos degenerados e, em menor numero de macrófagos, associado a hemorragia.	63
Figura 7: Suíno grupo G1 (vacinado): infiltrado acentuado de macrófagos e infiltrado linfocítico multifocal leve entre as fibras musculares, delimitado por tecido de granulação.	63
Figura 8: Representação dos níveis de expressão gênica de TLR4 (1), IL2 (2), IL1 β (3) e TNF α (4) em amostras de sangue total provenientes de suínos experimentalmente desafiados com <i>P. multocida</i> previamente vacinados ou não, colhidas três dias após infecção.	66

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Delineamento experimental da vacinação dos camundongos para avaliação de inocuidade e eficácia de diferentes adjuvantes.....	36
Tabela 2: Percentual de camundongos mortos em cada grupo de camundongos imunizados com diferentes adjuvantes.....	37
Tabela 3: Esquema experimental utilizado no experimento.....	40
Tabela 4: Percentual de animais com aumento de volume no local de aplicação da vacina em cada grupo e nos diferentes momentos.....	42
Tabela 5: Alterações macroscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.....	43
Tabela 6: Percentual de animais com reação vacinal no local de aplicação da vacina em cada grupo experimental.	44
Tabela 7: Alterações microscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.....	46
Tabela 8: Percentual de animais com reisolamento bacteriológico de <i>P. multocida</i> nos diferentes grupos experimentais.	48
Tabela 9: Delineamento experimental do desafio de suínos com uma cepa de <i>P. multocida</i> heteróloga à da vacina.....	53
Tabela 10: Genes de controles e citocinas, primers específicos, tamanho dos pares de bases e referência para protocolos de amplificação.	56
Tabela 11: Percentual de animais com reação vacinal no local de aplicação da vacina em cada grupo experimental.	59
Tabela 12: Alterações macroscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.....	60
Tabela 13: Alterações microscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.....	61
Tabela 14: Percentual de animais com reisolamento de <i>P. multocida</i> no por grupo experimental.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CDRS	Complexo de doenças Respiratórias dos Suínos
Cdna	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cq	“Quantification cycle”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
IHQ	Imunohistoquímica
Kb	Quilobases ou 1000 unidades de bases
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
Ng	Nanograma
NFkB	Fator de Transcrição nuclear kB
NK	“Natural Killer”
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogênicos
Pb	Pares de bases
PBS	Solução Fosfato-Salina (Tampão)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
RNA	Ácido ribonucleico
RT	“Reverse transcription” - Transcrição Reversa
rt RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
Th	T <i>helper</i>
TLRs	Receptores Toll-Like
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tm	“Melting temperature” – Temperatura de dissociação
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	25
2.1.1 Imunidade e vacinação.....	27
2.2 ADJUVANTES VACINAIS	29
2.2.1 Sais de Alumínio	31
2.2.2 SEPPIC®.....	32
3 DESENVOLVIMENTO	33
CAPITULO I.....	35
4 IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS COM VACINAS PREPARADAS COM DIFERENTES ADJUVANTES.....	35
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.2 RESULTADOS	36
4.3 DISCUSSÃO.....	37
4.4 CONCLUSÃO	38
CAPITULO II.....	39
5 TESTE DE DOIS ADJUVANTES UTILIZADOS NA VACINAÇÃO DE SUÍNOS FRENTE AO DESAFIO COM UMA CEPA HOMÓLOGA DE <i>P. multocida</i>.	39
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1.1 Delineamento experimental.....	39
5.1.2 Histopatologia e Imunomarcção de <i>P. multocida</i>.....	40
5.1.3 Isolamento e identificação de <i>P. multocida</i>.....	41
5.2 RESULTADOS	41
5.2.1 Sinais Clínicos.....	41
5.2.2 Lesões.....	42
5.2.3 IHQ da <i>P. multocida</i>	47

5.2.4 Reisolamento da <i>P. multocida</i>	48
5.3 DISCUSSÃO	49
5.5 CONCLUSÃO	51
CAPITULO III	52
6 DESAFIO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS COM UMA CEPA DE <i>P. multocida</i> HETERÓLOGA À DA VACINA.	52
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS	52
6.1.1 Delineamento experimental	52
6.1.2 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes.....	53
6.1.2.1 Extração de RNA.....	53
6.1.2.2 Transcrição reversa (RT)	54
6.1.2.3 PCR em tempo real (qPCR).....	54
6.1.2.4 Primers.....	55
6.2 RESULTADOS	57
6.2.1 Sinais Clínicos	57
6.2.2 Lesões.....	58
6.2.3 Imunomarcção de <i>P. multocida</i>	64
6.2.4 Reisolamento de <i>P. multocida</i>	64
6.2.5 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes.....	65
6.3 DISCUSSÃO	67
6.4 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

INTRODUÇÃO

Os problemas respiratórios em suínos de criação intensiva são de etiologia complexa, sendo causados pela interação entre dois ou mais agentes infecciosos, além da influência de fatores ambientais e de manejo. Agentes virais e micoplasmas normalmente atuam como agentes primários, baixando os mecanismos de defesa do hospedeiro para os invasores secundários, geralmente bactérias oportunistas (SORENSEN, et al., 2006).

Devido a estes fatores, o termo “complexo de doença respiratória do suíno” (CDRS) tem sido muito utilizado. Sendo ele definido como um problema respiratório multifatorial envolvendo infecções mistas com *Mycoplasma* spp, vírus respiratórios e bactérias oportunistas (THACKER, 2006), ou sendo considerado como um complexo respiratório com envolvimento de vários patógenos sem agentes específicos principais (KIM, et al., 2003; OPRIESSNIG, et al., 2007).

P. multocida é considerada um importante microorganismo que faz parte da microbiota residente do trato respiratório superior dos suínos que pode estar presente em pneumonias e pleurites. As do tipo capsular A estão relacionadas a processos pneumônicos, principalmente aqueles que resultam em pleurite e serosites (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; JIRAWATTANAPONG, et al., 2010; OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014).

A prevalência de *P. multocida* nas lesões pneumônicas em suínos tem se mantido alta nos estudos realizados ao longo do tempo no Brasil: 43% no Rio Grande do Sul, em suínos de abate com lesões de pneumonia e pleurite (STEPAN, 1995) e 51,3% em Santa Catarina, em lesões responsáveis por desvio de carcaças pelo serviço de inspeção sanitária (MORES, 2006). Trabalhos realizados em outros países também demonstram a alta prevalência deste agente: 43% em suínos da Noruega com lesões de pneumonia enzoótica (FALK, et al., 1991), 54% em

suínos com lesões de pleuropneumonia (HOIE, et al, 1991) e em 79% das lesões de broncopneumonia cranial em suínos da Dinamarca (HANSEN, et al. 2010).

O controle de *P. multocida* em rebanhos de suínos é feito basicamente pelo uso de antimicrobianos na forma de pulsos profiláticos na ração e/ou água, ou terapêutico via parenteral em caso de surtos da doença. Quanto a vacinação, existem duas vacinas inativadas comerciais indicadas para prevenção da pasteurelose pulmonar, todavia, sua efetividade tem sido questionada (PIJOAN, 2006). Sob condições de campo, veterinários clínicos que atuam na suinocultura brasileira tem obtido resultados insatisfatórios com o uso dessas vacinas. Uma possibilidade para isso é que as amostras contidas nessas vacinas sejam diferentes daquelas envolvidas nos quadros clínicos observados nas granjas. Além disso, nos últimos anos, quadros graves de pneumonia por *P. multocida* vem sendo observados, causando perdas severas em diversas criações de suínos, principalmente nas fases de crescimento e terminação (KICH, et al., 2007).

A identificação de amostras de *P. multocida* altamente patogênicas obtidas à campo e a reprodução experimental do quadro patológico confirmam a hipótese de atuação primária de *P. multocida* em casos de doenças respiratórias em suínos (KICH, et al., 2007; OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014).

O presente trabalho teve como objetivo específico estudar aspectos de proteção de uma vacina com amostras patogênicas da *P. multocida* em modelo experimental com suínos de “alto status sanitário”. E, de forma paralela, descrever expressão da resposta imune dos suínos induzida pela infecção da *P. multocida* e determinar a prevalência de *P. multocida*, por imunohistoquímica (IHQ), em tonsilas de suínos vacinados e não vacinados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PASTEURELLA MULTOCIDA*

P. multocida é um cocco-bacilo gram-negativo, com o tamanho de 0,5-1 x 1-2µm, anaeróbio facultativo, oxidase positivo, imóvel e indol positivo (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003; PIJOAN, 2006). É cultivado nos principais meios de enriquecimento com sangue ou soro em aerobiose por 18 a 24 horas a 37°C, no qual se observa o crescimento de colônias de um a três milímetros de diâmetros, com formas lisas e/ou mucóides e, em menor frequência, pode apresentar a forma rugosa (BOROWSKI, 2001; PIJOAN, 2006).

Até o momento foram identificados cinco sorotipos capsulares (A, B, D, E e F) e 16 sorotipos somáticos, sendo o sorotipo A (BOROWSKI, et al., 2002; PIJOAN, 2006, HERES, 2009) e os antígenos somáticos 3 e 5 (PIJOAN, 2006; REGISTER, 2012) os mais comumente encontrados em lesões pneumônicas em suínos.

A *P. multocida* induz quadros clínicos variáveis, dependendo do grau de imunidade do animal, da virulência da cepa e do sorotipo envolvido (PIJOAN, 2006; HONNOLD, 2009; KICH, et al., 2010).

Os sinais na forma septicêmica se caracterizam por dispneia, respiração abdominal, prostração e temperatura corporal alta (até 42,2°C). A mortalidade pode chegar a 40%. Na forma clínica subaguda observa-se temperatura corporal de até 41,6°C, tosse frequente - que inicia seca e evolui para produtiva - e respiração abdominal. A forma crônica é a mais comum e afeta, com maior frequência, animais entre 10 e 16 semanas. Os sinais são semelhantes aos da pneumonia causada por *M. hyopneumoniae*, e normalmente em associação com este agente, caracteriza-se por espirros, tosse seca persistente e redução do ganho de peso. O quadro clínico tem duração de 3 a 5 semanas (MARTÍN, et al., 2005).

As lesões ocorrem na cavidade torácica, típicas de broncopneumonia purulenta, caracterizadas por consolidação crânio-ventral, edematosa, de coloração cinza a rosada. Lesões graves, quando crônicas, induzem a necrose e formação de abscessos pulmonares com aderência da pleura à parede torácica, sendo esta de aspecto translucido e seco (MARTÍN, et al., 2005). Pleurite fibrinosa sem comprometimento pulmonar também é relatado como forma de infecção (MORES, 2006). As lesões microscópicas são similares às relatadas na maioria das pneumonias bacterianas com broncopneumonia exsudativa, presença de neutrófilos no exsudato mucopurulento nos brônquios e alvéolos, pleurite fibrinopurulenta, áreas de necrose alveolar e formação de abscessos (MORES, 2006), além disso, nefrite intersticial associada à broncopneumonia (BOROWSKI, et al., 2002; OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014) também tem sido relatadas.

Todavia, vários estudos apontam a *P. multocida* como agente primário de pneumonias (SMITH, et al., 1973, ONO, et al., 2003, KICH, et al., 2007; CAPPUCCIO, et al., 2004; PORS, et al., 2011 GOTTSCHALK, 2012; OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014). Caracterizado por lesões de consolidação pulmonar e nódulo fibrinohemorrágico no lobo diafragmático, além, dessas, Oliveira Filho, J.X., (2014) encontrou líquido avermelhado turvo com fibrina na cavidade torácica e dentro do saco pericárdico.

Os sinais clínicos e lesões macro e microscópicas, na maioria das vezes, não são suficientes para o diagnóstico definitivo da pasteurelose pulmonar. O diagnóstico em suínos deve ser feito considerando o histórico do surto, as alterações clínicas, lesões e identificação do agente após isolamento bacteriano das lesões (REGISTER, et al., 2012).

Metodologias moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se “primers” específicos para identificação de *P. multocida* e seus sorotipos (A, B, D, E e F) tem sido utilizadas com sucesso (TOWNSEND, et al., 2000), e

reproduzida por vários outros autores (EWRS, et al., 2006; BETHE, et al., 2009 e TANG, et al., 2009), assim como para a identificação de seus genes de virulência (HARPER, et al., 2006; EWERS, et al., 2006). Todavia, tais genes parecem não estarem associados ao desenvolvimento de lesões em granja não comerciais de suínos (OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014).

O controle das infecções respiratórias causadas pela *P. multocida* inclui três principais fatores: o fornecimento de boas condições ambientais e de manejo aos animais, a utilização de antimicrobianos e a vacinação.

A grande diversidade de sorotipos e cepa da *P. multocida* e a dificuldade no entendimento da patogenicidade limitam o desenvolvimento de vacinas comerciais para pasteurelose pulmonar. Bacterinas adjuvadas são utilizadas com bons resultados, no entanto, apenas com proteção contra sorotipos homólogos (MORES, 2010).

2.1.1 Imunidade e vacinação

O sistema imunológico é uma rede de interações celulares que protege o organismo contra potenciais perigos que podem ser causados pela entrada de partículas estranhas, tais como bactérias, vírus e fungos. Em respostas aos agentes invasores o organismo produz os linfócitos B e T, células natural killer (NK) e a linhagem mielóides. Os linfócitos são as peças chave no sistema imunitário adaptativo. Os linfócitos B desempenham um papel na imunidade humoral, após a ligação do antígeno ao receptor do citoplasma diferenciam-se em plasmócitos e produzem o anticorpo. Linfócitos T, por outro lado diferenciam-se na medula óssea, e ficam armazenadas no timo, onde passam por um processo de seleção, e tornam-se apresentadoras de antígeno (APC) (KUBATZKY, 2012).

A linhagem mielóide pode ser subdividida em dois ramos principais, um proveniente de granulócitos/monócitos e o outro precursor de eritrócitos e plaquetas. Cada célula do

sistema imune tem uma tarefa específica na detecção e compensação de um agente patogênico invasor, tendo a capacidade de se comunicar umas com as outras, a fim de coordenar uma resposta imune eficiente. A ação contra patógenos permite a apresentação do antígeno digerido por meio do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) para as células T. Dependendo do antígeno detectado, ocorre a estimulação das células T imaturas (SABATTÉ, et al., 2007), que dão origem as células T auxiliares chamadas de T helper (Th) tipo Th1 ou Th2 (GUERMONPREZ, et al., 2002). As citocinas são mediadores importantes da resposta imunitária celular, regulam a duração e intensidade das respostas específicas, recrutam células efetoras para as áreas onde se desenvolvem as respostas e induzem a geração e maturação de novas células a partir de precursores. Além disso, o padrão de citocinas liberada pelas células Th determina a resposta imune final dada por estas células. As células Th1 secretam interleucina 2 (IL-2), *interferon gama* (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e participam nas respostas imunitárias mediadas por células. As células Th2 são auxiliares importantes para as células B através da produção de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10).

As células imunológicas expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem especificamente padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs). Receptores da imunidade inata são receptores de membrana, tais como os receptores toll-like (TLRs), componentes solúveis que marcam substâncias microbianas para a detecção de receptores do complemento (UNDERHILL, 2003). TLRs são receptores de reconhecimento de padrões, eles não são ativados por ligações específicas, mas através do reconhecimento de PAMPs de organismos patogênicos, tais como lipopolissacáridos (lipídios e lipoproteínas), proteínas ou DNA e RNA de cadeia dupla

(AKIRA, et al., 2006). Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 estão localizados principalmente na superfície da célula para detectar PAMPs microbianas, TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados em compartimentos endossomais que permitem o reconhecimento eficiente de ácidos nucleicos virais ou bacterianos. A tarefa principal dos TLR é a ativação da expressão de fator de transcrição nucleares kB (NFkB) de citocinas inflamatórias (BLANDER & MEDZHITOV, 2004).

Existe pouco conhecimento sobre a imunidade das infecções respiratórias por *P. multocida* e nas granjas há grande quantidade de suínos infectados com o microorganismo, ainda que, por um pequeno numero de bactérias (CHANTER & RUTTER, 1989).

A rinite atrófica progressiva, por exemplo, é uma enfermidade associada à amostras toxigênicas de *P. multocida*. Essa toxina purificada é imunogênica e anticorpos produzidos contra ela protegem contra a doença (BOROWSKI, 2001). Contudo, estudos sobre a vacinação contra a pneumonia por *P. multocida* em suínos mostraram que a imunização de leitões com antígeno preparado com o agente inteiro ou extrato capsular de amostra toxigênica de *P. multocida* tipo capsular D reduziu efetivamente o desenvolvimento de lesões pulmonares quando o animal foi agredido com um sorotipo homólogo. Entretanto, a imunização com toxóide ou proteína da membrana externa não resultou em redução significativa das lesões pulmonares (BECHMANN, et al. 1992).

2.2 ADJUVANTES VACINAIS

Adjuvantes são usados para melhorar a resposta imune da vacina de diversas maneiras: aumentando a imunogenicidade de antígenos fracos; aumentando a velocidade e duração da resposta imune; modulando a avidéz, especificidade, isotipos ou distribuição de subclasses de anticorpos; induzindo uma imunidade de mucosas; aumentando

a resposta de indivíduos imaturos ou diminuindo a dose de antígeno utilizada nas vacinas. O estudo de novos adjuvantes para uso em vacinas inativadas tem como objetivo promover uma resposta imune humoral e celular mais efetiva, de extrema importância em medicina veterinária. Adjuvantes contendo sistemas de liberação de antígenos como o hidróxido de alumínio e a emulsão óleo/água são os mais utilizados nas vacinas comerciais, porém, em muitos casos, a eficiência destas vacinas não é boa, promovendo apenas uma proteção parcial, níveis de anticorpos protetores de curta duração e/ou estímulo de resposta celular deficiente (MOLITOR et al, 1985).

A ativação da resposta inata para a indução da imunidade adquirida através do recrutamento, ativação e maturação celular, surge como ponto chave para o sucesso dos adjuvantes (SINGH, 2007). Conhecidos como “sinal de perigo” pelo sistema imune, adjuvantes podem estimular tanto a imunidade inata como a adaptativa, resultando em uma resposta mais precoce com maior duração e magnitude, além de influenciar no tipo de resposta imune (COFFMANN, et al., 2010). Entretanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos imunes iniciais que precedem a diferenciação de células Th induzida por adjuvantes (KORSHOLM, et al., 2009) e se adjuvantes exercem sua atividade no local da imunização ou nos linfonodos (SCHIJS, 2000).

A resposta inflamatória merece atenção especial, uma vez que é rapidamente iniciada e independe do antígeno, além de preceder o início da resposta antígeno-específico (KORSHOLM, et al., 2009). A capacidade de indução de inflamação no local da imunização tem sido mostrada como uma característica compartilhada por vários tipos de adjuvantes conhecidos (SCHIJS, 2000). É notável a diferença entre a administração do antígeno sozinho, que resulta na ausência ou em baixa imunogenicidade, e a administração de antígeno associado ao adjuvante com indução da inflamação (SCHIJS, 2000).

Dentre os mediadores imunológicos, as citocinas inflamatórias produzidas por células da imunidade inata no local da imunização podem ser comunicadores essenciais para a atividade adjuvante (SCHIJNS, 2000). As citocinas são essenciais no desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, pois elas regulam, de forma autócrina e parácrina, a resposta imune, promovendo a migração de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (UCHI, et al., 2000; WILLIAMS & KUPPER, 1996). O mecanismo pelo qual adjuvantes induzem a produção de IL-12 ou IL-6/IL-4, levando à polarização da resposta das células Th é desconhecido. No entanto, a ativação seletiva de determinados tipos de células da imunidade inata ou de receptores em células da imunidade inata pode auxiliar no melhor entendimento da atividade adjuvante logo após a imunização (ROMANI, et al., 1997).

A complexidade na rede de citocinas formada após a sensibilização, torna difícil atribuir à atividade de um adjuvante especial a uma ou mais citocinas. Algumas citocinas são cruciais para a imunogenicidade, tais quais: IFN- α/β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, pois influenciam a apresentação de antígenos e são importantes no desencadeamento da resposta inflamatória. Outras podem agir durante a expansão clonal e diferenciação de células T e B, como: IL-2, IL-4 e IFN- γ (BREWER, et al., 1996; SMITH, et al., 1998). É importante salientar que citocinas ou moléculas co-estimuladoras podem representar imunoestimulantes naturais ideais para a escolha racional de adjuvantes com toxicidade e reações locais mínimas (SCHIJNS, 2000).

2.2.1 Sais de Alumínio

Os derivados de alumínio são amplamente utilizados como adjuvantes em vacinas humanas e veterinárias desde a década de 30, mostrando excelentes resultados, além de

baratos, seguros e simples de formular. Induzem uma forte resposta do tipo Th2 e boa apresentação antigênica quando algum imunógeno está adsorvido. Entretanto, tem como desvantagem a não indução de resposta imune do tipo celular (COX e COULTER, 1997).

2.2.2 *SEPPIC*®

SEPPIC® são formulações adjuvantes novas, cujas formulações não são bem claras, sendo parte delas consideradas segredos industriais. A *SEPPIC*® apresenta três linhas de produtos: Montanide ISA, Montanide IMS e Montanide GEL. Sendo selecionados duas variações de Montanide ISA e uma de Montanide Gel.

O Montanide™ GEL 01, recomendado para suínos e ruminantes, é um adjuvante à base de água, projetado para melhorar a segurança e eficácia das vacinas tipo aquoso. São indutores de macrófago e devido a isto podem ser associados à capacidade de indução de resposta imune adaptativa, demonstra maior capacidade de indução de resposta imune humoral secundária, além de ser promissor no desenvolvimento de uma resposta imune por linfócitos T.

O Montanide™ ISA 206 VG é um adjuvante à base de óleo mineral que apresenta uma emulsão água-em-óleo-em-água (W/O/W). Atua estimulando a resposta humoral e celular, promovendo uma imunidade longa e duradoura. O Montanide™ ISA 760 VG, é a base de polímero lipofílico desenvolvido para emulsões de água-em-polímero. Porém, ele é capaz de melhorar a eficácia da vacina via a indução de uma forte e longa imunidade duradoura. É um adjuvante promissor para estimular a resposta humoral.

3 DESENVOLVIMENTO

O estudo da “Avaliação de vacina inativada contra *Pasteurella multocida* sorotipo A em suínos com alto status sanitário” faz parte do projeto de pesquisa “Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico e controle da pasteurelose pneumônica em suínos” da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC. Este aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES – CNPSA (CEUA/CNPSA), sob protocolo N° 005/2010.

Toda parte experimental e análises do estudo foram realizadas na Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC.

O estudo foi constituído por três experimentos, que estão descritos a seguir em forma de capítulos, para melhor entendimento. Sendo cada capítulo dividido em material e métodos, resultado, discussão e conclusão.

- Capítulo I - Imunização de camundongos com vacinas preparadas com diferentes adjuvantes.
- Capítulo II - Teste de dois adjuvantes utilizados na vacinação de suínos frente ao desafio com uma cepa homóloga de *P. multocida*.
- Capítulo III - Desafio experimental em suínos com uma cepa de *P. multocida* heteróloga à da vacina.

Quanto aos adjuvantes testados foram selecionados o Hidróxido de alumínio e três tipos de adjuvantes *SEPPIC*®: ISA 206, Montanide™ GEL 01 e ISA 760.

Análise estatística. Na avaliação do estudo em camundongos, dos sinais clínicos, lesões macro e microscópicas, e reisolamento da bactéria em suínos foi o teste exato de Fisher. A avaliação da expressão gênica da resposta imune dos suínos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação Dunn's Multiple.

Suínos utilizados nos projetos. Esses tinham peso médio de 35 kg e idade média de 75 dias. Os animais foram obtidos de um rebanho com monitoramento sanitário controlado, localizado na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brasil. Semestralmente, testes laboratoriais são realizados para assegurar a ausência de infecção pelos principais patógenos respiratórios (*P. multocida* A e D, *Bordetella bronchiseptica*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *M. hyopneumoniae* e vírus de influenza A). Além disso, doenças respiratórias como pneumonia enzoótica, influenza, polisserosite ou doença de Glässer, rinite atrófica, pleuropneumonia e pasteurelose nunca foram diagnosticadas nesta granja. O rebanho tem biossegurança estrita, barreiras sanitárias, salas fechadas com pressão interna positiva, restrição à visitação e monitoramento frequente.

Os animais foram transferidos para uma instalação de nível de biossegurança 2 localizada na sede do Complexo de Laboratórios de Sanidade Animal e Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, Brasil. Os suínos foram acomodados em salas com quatro e cinco baias (lotação máxima por baia de dois suínos) de acordo com cada grupo experimental. Foram fornecidos ração e água *ad libitum*. O acesso às salas com os suínos foi restrito apenas aos executores do experimento. A temperatura ambiente de cada sala foi monitorada diariamente.

Anteriormente à transferência dos suínos, foi realizada coleta de dois suabes, um de tonsila palatina para detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* pela técnica de Nested-PCR de acordo com Yamaguti, et. al (2008), e um suabe da cavidade nasal para realização de bacteriológico de rotina para detecção de outros patógenos respiratórios (QUINN, et al., 2011).

CAPITULO I

4 IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS COM VACINAS PREPARADAS COM DIFERENTES ADJUVANTES.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para testar a eficácia e inocuidade dos diferentes adjuvantes vacinais foram formados 5 grupos com 30 camundongos cada.

Os camundongos foram alojados em uma instalação de nível de biossegurança dois, em caixas de polipropileno autoclavável, com borda superior reforçada, tampa em arame galvanizado, cama de maravalha e capacidade para cinco camundongos. Foram fornecidos ração e água *ad libitum*.

Na composição do protótipo de vacina foram utilizadas três cepas patogênicas de *P. multocida* pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Suínos e Aves (cepas 002, 003 e 004). As três cepas foram cultivadas em separado, inativadas com formaldeído, reconstituídas em solução fosfato-salina (PBS) em mesmo volume. As vacinas eram compostas pelo antígeno, conservante (timerosal), e adjuvantes e foram submetidas a testes de esterilidade conforme o indicado pelo fabricante do adjuvante. Foram testados quatro adjuvantes vacinais: hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$, ISA 206, Montanide™ GEL 01 e ISA 760. Para isso formou-se cinco grupos de camundongos: Controle (água peptonada), $\text{Al}(\text{OH})_3$, ISA 206, Montanide™ GEL 01 e ISA 760.

Os camundongos foram vacinados por via subcutânea, com dose de 0,5mL no dia zero do experimento, revacinados 14 dias após e desafiados 14 dias após a revacinação, por via intraperitoneal, com 100 μL de inóculo (10^2 UFC/camundongo). Os camundongos do grupo controle

seguiram o mesmo delineamento, mas foram vacinados com água peptonada subcutânea. A amostra utilizada para o desafio foi a mais patogênica dentre as três utilizadas no preparo da vacina (cepa 003). Os camundongos foram acompanhados por 21 dias após o desafio, período em que as mortes foram anotadas. Os sobreviventes foram eutanasiados após este período. O delineamento experimental está expresso na tabela 1. De todos os camundongos foi colhido suabe de coração e realizada tentativa de reisolamento bacteriano, através de sementeira.

Tabela 1: Delineamento experimental da vacinação dos camundongos para avaliação de inocuidade e eficácia de diferentes adjuvantes.

Adjuvante	Dias de experiment			
	0	14	28	49
	Vacinação	Revacinação	Desafio	Eutanásia
Controle	Água peptonada	+	003	+
Al(OH) ₃	+	+	003	+
ISA 206	+	+	003	+
Montanide™				
GEL 01	+	+	003	+
ISA 760	+	+	003	+

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

4.2 RESULTADOS

Não houve mortalidade de camundongos logo após a vacinação, indicando inocuidade das vacinas produzidas com os diferentes adjuvantes. Todavia, 13 camundongos vacinados com ISA 206 apresentaram reação adversa no local da aplicação. Em relação ao resultado vacinal (Tabela 2), houve menores índices de mortalidade nos grupos de camundongos imunizados previamente com as vacinas Al(OH)₃ (6,67%) e Montanide™ GEL 01 (10%) quando comparados aos grupos

previamente imunizados com as vacinas ISA 206 e ISA 760 (36,67%). No grupo controle de infecção todos os camundongos morreram em até 24h após o desafio. A *P. multocida* foi reisolada em todos os camundongos com morte espontânea e não foi recuperada naqueles eutanasiados.

Tabela 2: Percentual de camundongos mortos em cada grupo de camundongos imunizados com diferentes adjuvantes.

Adjuvante	Nº de animais	Nº de mortos	Mortalidade (%)
Controle	30	30	100
Al(OH) ₃	30	2	6,67%
ISA 206	30	11	36,6%
Montanide™			
GEL 01	30	3	10%
ISA 760	30	11	36,6%

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

4.3 DISCUSSÃO

No desenvolvimento do estudo levou-se em consideração a mortalidade e reações adversas pós-imunização dos camundongos como teste de inocuidade. Os adjuvantes testados na formulação da vacina apresentam distintas características entre si. Os melhores resultados observados ocorreram com o Al(OH)₃, que atua formando depósitos de antígenos e imunoestimulação (HOGENESCH, 2002). Segundo Resende, et al., (2004) esse adjuvante estimula principalmente, a resposta humoral (tipo Th2), associada à produção de IL-4 e IgG1 e, induz resposta celular de forma reduzida devido ao retardo na apresentação de linfócitos T CD4+ no sítio inflamatório. O segundo melhor resultado obtido foi com Montanide™ GEL 01, este é indutor de macrófagos e devido a isto, pode ser associado à capacidade de indução de resposta imune adaptativa. Os outros dois grupos, ISA 206 e

ISA 760 são adjuvantes oleosos, recentes no mercado, mas com potencial promissor, pois, estas emulsões oleosas resultam em uma excelente apresentação antigênica (COX e COUTER, 1997). No experimento estes adjuvantes, podem não ter estimulado completamente o sistema imune dos camundongos, pois, apresentam uma liberação lenta de antígenos e promovem uma estimulação duradoura do sistema imune (BOMFORD, 1997).

Em função desses resultados, para os testes em suínos, foram selecionados os adjuvantes $\text{Al}(\text{OH})_3$ com melhor resultado nos camundongos e ISA 760. Este último foi escolhido por ser um adjuvante oleoso, diferente do $\text{Al}(\text{OH})_3$, e dentro dos oleosos por não ter provocado reação neste experimento no local de aplicação. Optou-se ainda, pelo ISA 760 para saber se a resposta em suínos seria semelhante a obtida nos camundongos.

4.4 CONCLUSÃO

1. Todas as vacinas apresentaram bons resultados de inocuidade, sem nenhuma mortalidade pós-imunização.
2. A bactéria foi reisolada somente nos camundongos que morrem de forma espontânea.
3. $\text{Al}(\text{OH})_3$ conferiu melhor proteção contra *P. multocida* aos camundongos.
4. ISA 206 neste experimento causou reação adversa no local da aplicação nos camundongos.
5. Foram selecionados o $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o ISA 760 para os testes em suínos.

CAPITULO II

5 TESTE DE DOIS ADJUVANTES UTILIZADOS NA VACINAÇÃO DE SUÍNOS FRENTE AO DESAFIO COM UMA CEPA HOMÓLOGA DE *P. multocida*.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Delineamento experimental

Dos quatro adjuvantes testados nos camundongos, foram selecionados dois para teste em suínos: $\text{Al}(\text{OH})_3$, que apresentou melhor eficácia nos camundongos e ISA 760, por ser um adjuvante oleoso.

Doze suínos foram distribuídos em três grupos, cada um com quatro repetições. G1 - Controle de infecção; G2 – Vacinados com vacina produzida com três cepas de *P. multocida* A e adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ e G3 – Vacinados com vacina produzida com três cepas de *P. multocida* A e adjuvante ISA 760. Todos os grupos foram desafiados com a cepa mais patogênica dentre as três que compõe a vacina (cepa 003). Os suínos dos G2 e G3 foram vacinados no dia zero (0), revacinados pós 21 dias, ambos com dose de 2 ml por via subcutânea; desafiados 35 dias após a primeira dose da vacina e eutanasiados 42 dias após a vacinação (7 após o desafio), para necropsia e coleta de material (Tabela 3). Para o desafio utilizou-se 3,0 mL (1,5 mL/por narina) do inóculo contendo 10^7 UFC/mL de *P. multocida*, administrado por gotejamento lento via intranasal com os suínos na posição sentada. Os suínos do G1 seguiram o mesmo delineamento, mas foram vacinados com água peptonada subcutânea.

Os suínos foram avaliados clinicamente duas vezes por dia (8 e 16 horas), iniciando três dias antes do início do experimento, até cinco dias após as vacinações e três dias antes

e sete dias a pós a inoculação. Os parâmetros avaliados foram: temperatura corporal retal, dispneia e tosse observadas após a movimentação dos suínos, e avaliação visual do local da aplicação da vacina, como: normal, local inchado e local inchado com formação de nódulo. Na necropsia, para exame bacteriológico, foram colhidos sob refrigeração suabes de cavidade nasal, pleura, pericárdio, local da aplicação da vacina e fragmentos de pulmão, linfonodo mediastínico, tonsila, fígado e baço; e em formalina tamponada, para histologia de rotina e IHQ, fragmentos de tonsila, pericárdio, pulmão, pleura, linfonodo mediastínico, fígado, baço e músculo do local da aplicação da vacina.

Tabela 3: Esquema experimental utilizado no experimento.

Adjuvante	Dias de experimento			
	0	21	35	42
	Vacinação	Revacinação	Desafio	Eutanásia
G1- Controle	Água peptonada	+	cepa 003	+
G2- Al(OH) ₃	+	+	cepa 003	+
G3- ISA 760	+	+	cepa 003	+

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

5.1.2 Histopatologia e Imunomarcção de *P. multocida*

As amostras colhidas foram processadas seguindo os procedimentos de rotina e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Amostras de lesões pulmonares e tonsilas foram selecionadas para ensaios de imunohistoquímica para detecção de *P. multocida*. O ensaio foi feito pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase utilizando um kit comercial (Kit LSABTM + System – HRP da Dako

Cytomation™) e anticorpo policlonal hiperimune anti- *P. multocida* produzido em ovinos, adotando-se a técnica descrita por Oliveira Filho, J.X., (2014).

Como controles positivo e negativo da reação, foram utilizados fragmentos de pulmão com pneumonia de suínos inoculado com *P. multocida* tipo A, e de pulmão de suíno com “alto status sanitário”, respectivamente. Os resultados foram expressos de acordo com a presença ou ausência de marcação antigênica.

5.1.3 Isolamento e identificação de *P. multocida*

Amostras de tecido, suabe e exsudato dos animais necropsiados foram semeados em placas de ágar sangue e ágar MacConkey (Difco™) e incubados a 37°C por 18-24 horas sob condição aeróbica. Colônia nutris de *Staphylococcus aureus* foi adicionada nas placas de ágar sangue e estas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 24-48 hrs. As amostras de *P. multocida* foram caracterizadas bioquimicamente de acordo com Quinn et al., (2011) para confirmação da espécie.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Sinais Clínicos

No grupo controle, no período anterior à vacinação não houve alterações clínicas. Após ao desafio todos os suínos apresentaram febre com dispneia e prostração em todas as avaliações, nos intervalos de 8hrs a 56hrs. No G2, os sinais clínicos foram observados somente após as vacinações. Caracterizada por febre em dois suínos após 32hrs da primeira dose da vacina e em um suíno após 8 horas da segunda dose. No G3 os sinais clínicos foram observados após a vacinação e

após o desafio. Após a primeira dose da vacinação dois suínos apresentaram febre na avaliação de 32hrs. Na segunda dose da vacinação três suínos apresentaram febre durante as avaliações de 8hrs e 24hrs, dois destes mantiveram febre com dispneia até 32hrs. Após o desafio dois suínos manifestaram sinais clínicos, um deles teve febre nos intervalos de 8hrs e o outro febre e dispneia nos períodos de 8hrs até 96hrs. Além disso, todos os animais do grupo apresentaram aumento de volume no local da aplicação após a segunda dose da vacina, que se manteve evidente em dois suínos até a eutanásia (Tabela 4).

Tabela 4: Percentual de animais com aumento de volume no local de aplicação da vacina em cada grupo e nos diferentes momentos.

Período	Vacina			P
	G1- Controle (n=4)	G2- Al(OH) ₃ (n=4)	G3- ISA 760 (n=4)	
Dose 1	0,00	0,00	0,00	-
Dose 2	0,00 ^a	0,00 ^a	100,0 ^b	0,0061
Desafio	0,00	0,00	50,00	0,2727
Período total	0,00 ^a	0,00 ^a	100,0 ^b	0,0061

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;

Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

5.2.2 Lesões

Devido à intensidade dos sinais clínicos, os suínos do grupo controle foram eutanasiados entre o terceiro e quarto dia após o desafio. Os demais suínos foram eutanasiados sete dias após o desafio conforme o delineamento.

O aumento dos linfonodos mediastínicos e nódulos no local da aplicação foram às lesões observadas em todos os grupos. As lesões encontradas na necropsia estão descritas na tabela 5.

As principais alterações macroscópicas observadas no grupo controle foram hidrotórax, consolidação pulmonar, nódulo necrohemorrágico, edema interlobular e exsudação de fibrina na pleura e pericárdio (Figuras 1 e 2), aumento de linfonodos mediastínicos, peritonite fibrinosa. Em todos os grupos experimentais observou-se reação vacinal no local da aplicação da vacina (Tabela 6).

Tabela 5: Alterações macroscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.

Alterações Macroscópicas	Vacinas			P
	G1- Controle (n=4)	G2- Al(OH) ₃ (n=4)	G3 - ISA 760(n=4)	
Consolidação pulmonar				
Lobo apical direito	50.00	0.00	0.00	0.2727
Lobo apical esquerdo	0.00	0.00	0.00	-
Lobo cardíaco direito	75.00 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.0545
Lobo cardíaco esquerdo	25.00	0.00	0.00	1.0000
Lobo diafragmático direito	0.00	0.00	0.00	-
Lobo diafragmático esquerdo	0.00	0.00	0.00	-
Lobo intermediário	0.00	0.00	0.00	-
Nódulo pulmonar necrohemorrágico	75.00 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.0545
Pleurite fibrinosa	50.00	0.00	0.00	0.2727
Edema interlobular	25.00	0.00	25.00	1.0000
Pericardite fibrinosa	50.00	0.00	0.00	0.2727
Aumento de linfonodos mediastínicos	25.00	25.00	50.00	1.0000
Peritonite	50.00	0.00	0.00	0.2727
Total de suínos com alguma alteração em geral	100.0	25.00	50.00	0.2121

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;
Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Na histologia as lesões variaram entre os grupos. As lesões observadas nos grupos vacinais G2 e G3 foram semelhantes entres si e consistiram em miosite granulomatosa acentuada no local da aplicação da vacina e pneumonia intersticial, com diferença estatística somente na miosiosite granulomatosa ($p=0.0303$), sendo mais elevada no G3 (ISA 760). No grupo controle as lesões histológicas mais frequentes foram pleuropneumonia fibrinonecrótica e pericardite fibrinosa aguda com diferença estatística com os grupos vacinados (G2 e G3). As lesões histológicas estão expressas na tabela 7.

Tabela 6: Percentual de animais com reação vacinal no local de aplicação da vacina em cada grupo experimental.

Alterações Macro/Microscópicas	Vacinas			P
	G1- Controle (n=4)	G2- Al(OH) ₃ (n=4)	G3- ISA 760 (n=4)	
Nódulo local da aplicação	25.00	25.00	100.0	0.1429
Miosite granulomatosa acentuada	0.00 ^b	25.00 ^b	100.0 ^a	0.0303
Total de suínos com alguma alteração em geral	25.00	50.00	100.0	0.2121

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;
Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p<0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Figura 1: Suíno do grupo controle: Hidrotórax, deposição de fibrina sobre a pleura visceral e consolidação do lobo cardíaco direito, com evidência na superfície de corte de exsudato bronquial mucopurulento (seta) e nódulo necrohemorrágico (área circunscrita).



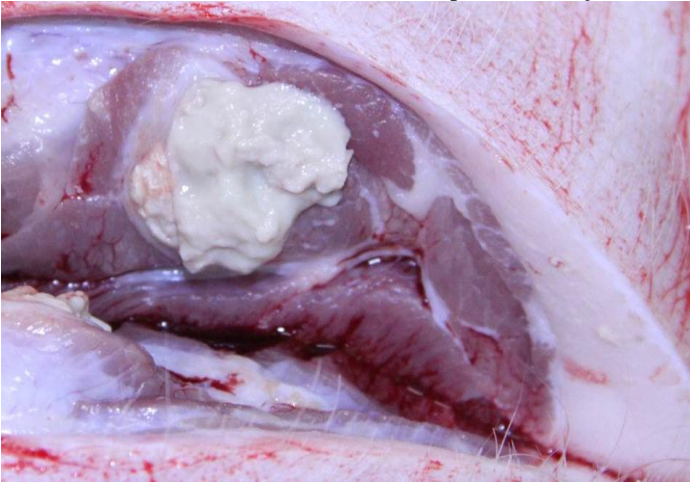
Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Figura 2: Suíno do grupo controle: Hidrotórax, deposição difusa de fibrina sobre a pleura visceral e pericárdio e edema interlobular.



Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Figura 3: Suíno do grupo ISA 760: Granuloma no local da aplicação da vacina (músculo romboide) 42 dias após a vacinação.



Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Tabela 7: Alterações microscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.

Alterações Microscópicas	Vacinas			P
	G1- Controle (n=4)	G2- Al(OH) ₃ (n=4)	G3- ISA 760 (n=4)	
Linfadenite supurativa moderada	50.00	0.00	0.00	0.2727
Hepatite necrótica multifocal leve	25.00	0.00	0.00	1.0000
Pericardite fibrinosa aguda	75.00 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.0545
Periesplenite fibrinossupurativa	25.00	0.00	0.00	1.0000
Pleuropneumonia fibrinonecrótica	100.0 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.0061
Pneumonia intersticial	0.00	75.00	75.00	0.1429
Total de suínos com alguma alteração em geral	100.0	75.00	100.0	1.0000

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher; Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Lesões pulmonares macroscópicas, caracterizadas por consolidação foram observadas apenas no controle e tiveram diferença significativa com os grupos vacinados (G2 e G3). A lesão foi mais frequente no lobo cardíaco direito, caracterizada na histologia por parênquima alveolar com áreas multifocais de necrose de coagulação com fibrina e debris celulares, infiltrado moderado de neutrófilos na luz dos brônquios e bronquíolos e infiltrado de neutrófilos com exsudato fibrinoso acentuado na luz alveolar, às vezes associados a hemorragia e ou edema. A pleura estava espessada por proliferação de fibroblastos, exsudato fibrinoso e infiltrado de neutrófilos. Esta descrição histologia foi observada também nos nódulos necrohemorrágicos.

A pericardite, que foi frequente no grupo controle (75%), caracterizava-se por edema subpericárdico e acentuada exsudação fibrinosupurativa na superfície. Ainda nesse grupo, foi observado hepatite necrótica multifocal aleatória leve e linfadenite supurativa moderada.

Em 75% dos suínos dos G2 e G3 observaram-se lesões discretas de pneumonia intersticial caracterizada com áreas de espessamento dos septos interalveolares por infiltrado de macrófagos e linfócitos, além de hepatite periportal interlobular leve.

A reação vacinal (Tabela 6), classificada na histologia como miosite granulomatosa acentuada foi observada com maior frequência ($p=0,0303$) no G2 e G3, caracterizando-se por necrose de caseificação multifocal, às vezes com mineralização intralesional, circundada por macrófagos e em menor número neutrófilos delimitados por proliferação de tecido conjuntivo.

5.2.3 IHQ da *P. multocida*

A tonsila apresentava áreas de necrose na luz das criptas, com infiltrado moderado de eosinófilos e com

marcação imuno-histoquímica de *P. multocida* de intensidade moderada à elevada no exsudato das criptas e em macrófagos observada em todos os grupos.

5.2.4 Reisolamento da *P. multocida*

A recuperação de *P. multocida* está descrita na tabela 8. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos. No G1, a *P. multocida* foi recuperada em todos os tecidos avaliados, exceto no suabe do local da vacinação. No G2, houve recuperação da *P. multocida* na tonsila e suabe nasal. No G3, houve recuperação da *P. multocida* somente na tonsila.

Tabela 8: Percentual de animais com reisolamento bacteriológico de *P. multocida* nos diferentes grupos experimentais.

Isolamento bacteriológico	Vacinas			P
	G1- Controle (n=4)	G2- Al(OH) ₃ (n=4)	G3- ISA 760 (n=4)	
Baço	50.00	0.00	0.00	0.2727
Fígado	50.00	0.00	0.00	0.2727
Linfonodo mediastínico	50.00	0.00	0.00	0.2727
Tonsila	50.00	25.00	25.00	1.0000
Pulmão	50.00	0.00	0.00	0.2727
Líquido da cavidade peritoneal	25.00	0.00	0.00	1.0000
Suabe do local da aplicação	0.00	0.00	0.00	-
Suabe nasal	25.00	50.00	0.00	0.7091
Suabe de pericárdio	25.00	0.00	0.00	1.0000
Suabe de pleura	25.00	0.00	0.00	1.0000
Líquido da cavidade torácica	50.00	0.00	0.00	0.2727
Nódulo pulmonar	25.00	0.00	0.00	1.0000
Reisolamento bacteriológico geral	100.0	75.00	25.00	0.2000

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher; Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

5.3 DISCUSSÃO

Nos resultados clínicos observou-se que alguns suínos apresentaram febre após a vacinação. Esses picos febris foram considerados como secundários a resposta inflamatória, que ocorre associada aos processos de imunização. Outros picos de febre foram observados após o desafio dos animais, principalmente no grupo controle e foram considerados como sinais clínicos da pasteurelose, pois altas temperaturas associadas à dispneia (respiração abdominal) foram descritas na forma aguda da pasteurelose pulmonar (MARTÍN, et al., 2005) e na reprodução experimental da pneumonia por infecção de cepas patogênicas de *P. multocida* (OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014).

A maioria das vacinas utilizadas na produção animal contra doenças bacterianas tem em sua formulação principalmente células inativadas (bacterinas) ou bactérias vivas atenuadas. As duas vacinas comerciais indicadas para prevenção da pasteurelose pulmonar tem em sua composição a bactéria inativada (PIJOAN, 2006). Os adjuvantes são adicionados à composição da vacina com o objetivo de amplificar a resposta inflamatória inicial induzida pela vacinação e aumentar a resposta imune ao antígeno específico (PRETO, et al, 1991).

Neste estudo, a vacina formulada baseou-se na bactéria inativada, juntamente com o adjuvante. As duas composições da vacina foram eficientes contra pasteurelose pulmonar, sendo confirmada a presença do agente nos animais através do reisolamento bacteriológico e imunomarcagem da *P. multocida* nas tonsilas. Contudo a vacina oleosa ISA 760 apresentou maior número de animais com reação vacinal no local da aplicação, o que inviabiliza sua utilização na prática em função da possibilidade de condenação dos animais pelo Serviço de Inspeção.

Os nódulos/cistos encontrados no local da aplicação da vacina também já foram descritos em testes com adjuvantes vacinais (BARTELING & VREESWIJK, 1991; GUPTA, et al., 1993). As vacinas com adjuvantes à base de óleo são bastante utilizadas em programas de controle de doenças na América do Sul (PATIL, et al., 2002) e outras partes do mundo. As emulsões lipídicas são conhecidas como os efetivos adjuvantes capazes de induzir uma resposta imune elevada e duradoura (HILLEMANN, 1966; EDELMAN, 1980; GUPTA & SIBER, 1995). Um dos maiores problemas encontrados para vacinas com adjuvantes oleosos é que o uso frequente pode resultar em reações adversas indesejáveis, tais como formação de granulomas e cistos, que são atribuídas a diversos fatores (BARTELING & VREESWIJK, 1991; GUPTA, et al., 1993). Os adjuvantes da linha ISA não são conhecidos por causar efeitos colaterais severos e são de baixa viscosidade (SEPPIC, 1994). Além disso, espécies animais diferentes respondem diferentemente aos vários adjuvantes e, mesmo dentro da mesma espécie animal, linhagens diferentes respondem de modo diverso (GUPTA & SIBER, 1995).

As principais lesões encontradas de pleuropneumonia fibrino necrótica, pleurite e pericardite, também foram encontradas por Ono, et al., (2003), Cappuccio, et al., (2004), López, (2007), Oliveira Filho, J.X., (2014). Em alguns animais observaram-se, focos de pleuropneumonia necrohemorrágica referidos como "*A. pleuropneumoniae like*", em função da semelhança com as lesões de infecção com o *Actinobacillus pleuropneumoniae* (KICH, et al., 2007, GOTTSCHALK, 2012). As lesões fibrinosas observadas nas serosas são relevantes. Estas se assemelham àquelas causadas por *H. parasuis* na doença de Glässer (VAHLE, et al., 1995), e foram descritas também por Oliveira Filho, J.X., (2014) como possível explicação de parte das pleurites e pericardites crônicas observadas no abate, pois, frequentemente a *P.*

multocida é associada com pleurite em animais de abatedouro (JIRAWATTANAPONG, et al., 2010).

Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais evidenciaram *P. multocida* utilizada no desafio, como causa primária de doença respiratória em suínos cursando com septicemia (OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014).

O fato de vários suínos dos grupos vacinados apresentarem lesões de pneumonia intersticial o qual não é característico de pasteurelose pulmonar, não tem uma explicação convincente. Os testes de IHQ para *circovirus* suíno tipo 2 (PCV2), *M. hyopneumoniae*, *Salmonella sp* e foram negativos e não havia lesões sugestivo de influenza. Acreditasse que, pelo fato dos suínos vacinados terem sido alojados na mesma sala, esta apresentava algum fator de ambiente que possa ter ocasionado a pneumonia intersticial, pois os suínos do grupo controle, alojados em outra sala, não apresentaram esse tipo de lesão. Talvez esta lesão seja uma consequência de uma reação alveolar para debelar a infecção em parceria com a soro-proteção.

5.5 CONCLUSÃO

1. As vacinas produzidas com os adjuvantes $Al(OH)_3$ e ISA 760, foram eficientes na prevenção da pasteurelose.
2. A vacina produzida com o adjuvante ISA 760 provocou granulomas no local da aplicação que compromete sua utilização à campo.
3. A *P. multocida* comportou-se como agente primário nesse experimento.

CAPITULO III

6 DESAFIO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS COM UMA CEPA DE *P. multocida* HETERÓLOGA À DA VACINA.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Delineamento experimental

Dos dois adjuvantes inicialmente testados em suínos selecionou-se o $\text{Al}(\text{OH})_3$, que apresentou proteção contra pasteurelose pulmonar sem reação vacinal.

Foram distribuídos 18 suínos em três grupos: grupo 1 (G1) - vacina com $\text{Al}(\text{OH})_3$, grupo 2 (G2) – controle de infecção aplicado água peptonada com o adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ na mesma dose e local da vacinação do G1, e grupo 3 (G3) controle negativo. Os dois primeiros com sete repetições e o último com quatro.

Os grupos G1 e G2 foram desafiados com uma cepa de alta patogenicidade (cepa 001), heteróloga às três que utilizadas no preparo da vacina. O grupo G3 foi desafiado com solução salina estéril. Os suínos foram vacinados no dia zero, revacinados pós 21 dias, ambos com dose de 2 ml, por via subcutânea, desafiados 42 dias após a primeira dose da vacina e eutanasiados 49 dias após a vacinação (7 após o desafio), para necropsia e coleta de material. Para o desafio utilizou-se 3,0 mL (1,5 mL/por narina) do inóculo com 10^7 UFC/mL de *P. multocida*, administrado por gotejamento lento via intranasal com os suínos na posição sentada. O delineamento experimental esta expresso na tabela 9.

As avaliações clínicas realizadas durante o período experimental e o material colhido para a histopatologia e bacteriologia, foram os mesmos citados anteriormente no capítulo II, assim como as técnicas de processamento de cada

material. Além das análises microbiológicas e patológicas, foi realizada a quantificação da expressão dos genes relacionados à resposta imune das citocinas (IL1 β , IL2, TNF α) e do TLR4. Para isso, no terceiro dia após o desafio, foram colhidas amostras de sangue dos suínos, acondicionadas na proporção 1:3 em Trizol LS Reagent® (Invitrogen), e armazenadas a -20°C até o processamento.

Tabela 9: Delineamento experimental do desafio de suínos com uma cepa de *P. multocida* heteróloga à da vacina.

Adjuvante	Dias de experimento			
	0	21	42	49
	Vacinação	Revacinação	Desafio	Eutanásia
G1- Al(OH) ₃	Ag + Adjuvante Al(OH) ₃	+	Cepa 001	+
G2- Cont. de infecção	Água peptonada + Adjuvante Al(OH) ₃	+	Cepa 001	+
G3- Cont. negativo	Água peptonada	+	Solução o salina esteril	+

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

6.1.2 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes

6.1.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA das amostras de sangue foi realizada com o uso do kit Trizol Reagent (Invitrogen) seguindo o protocolo de Okino, (2010) para amostras de sangue. O RNA eluído foi armazenado a -70°C.

6.1.2.2 *Transcrição reversa (RT)*

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com uso do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), incubando-se a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C ∞: aproximadamente 500 ng de RNA total extraído, dNTP 4 mM, 0,5 µg de OligodT (IDT), transcriptase reversa Multiscribe, Inibidor da RNase (40 u). O volume final da reação foi de 30 µl, a qual foi armazenada a -20°C para realização da técnica de PCR em tempo real.

6.1.2.3 *PCR em tempo real (qPCR)*

Após a extração do RNA com o kit Trizol Reagent (Invitrogen) e o preparo de cDNA na técnica de RT descrita anteriormente, foi realizado o qPCR, utilizando o kit Quantifast SYBR Green PCR kit (Qiagen), as reações foram realizadas no aparelho Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen). Foi utilizado um volume de 2µl de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 7,5µl de *Quantifast* SYBR Green RT-PCR Kit (Invitrogen), 5 pmol de cada “primer”, completando-se com água para um volume final de 15µl.

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2mL (Axygen). Essa técnica foi realizada para a quantificação relativa da expressão gênica das citocinas (IL1 β, IL2, TNFα) e do TLR4.

O gene de referência foi selecionado após a avaliação da estabilidade de expressão nas amostras utilizadas, para tanto foram testados GAPDH, Ubiquitin, TOP2B, Histone H3 e HPRT1. Os valores de “quantification cycle” (Cq) obtidos foram utilizados para análise nos programas computacionais Bestkeeper e Normfinder, sendo que o gene de maior grau de

estabilidade foi utilizado para normalização dos resultados de expressão gênica.

O perfil térmico da PCR foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por cinco minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos compostos por 15 segundos a 95°C, 35 segundos a 60°C. Ao final dessa etapa de 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C, para a avaliação da temperatura de dissociação (T_m). Todas as amostras foram testadas em duplicata. O valor “Quantification cycle” (Cq) foi estabelecido neste estudo como o número de ciclos necessários para que a amostra analisada atinja a fluorescência de 0,02.

6.1.2.4 Primers

Os primers foram delineados para flanquear pelo menos uma junção exon-exon do mRNA, de acordo com sequências gênicas descritas no Genbank e Ensembl (Tabela 10).

Tabela 10: Genes de controles e citocinas, primers específicos, tamanho dos pares de bases e referência para protocolos de amplificação (Continua).

Gene	Primers (5'-3')	Reference	Location (nt)	Amplicon
GAPDH	Forward: 5' TCCTGGGCTACACTGAG GAC 3'	NM_001 206359. 1	912- 1034	123 bp
	Reverse: 5' ACCAGGAAATGAGCTT GACC 3'			
TOP2B	Forward: 5' GAAGAGCTGCTGCTGA AAGG 3'	NM_001 258386. 1	4058- 4225	168 bp
	Reverse: 5' CCTTATCGAGGCCATCT GAA 3'			
UBIQUITIN	Forward: 5' ACCAGCAGCGTCTGATT TTT 3'	U72496. 1	151- 242	92 bp
	Reverse: 5' CAAGTGCAGGGTGGAC TCTT 3'			
HPRT1	Forward: 5' AAGCTTGCTGGTGA AGGA 3'	NM_001 032376. 2	579- 678	100 bp
	Reverse: 5' GTCAAGGGCATAGCCT ACCA 3'			
Histone H3	Forward: 5' GTAAAGCACCG AGGAAGCAACT 3'	NM_213 930	99-189	91 bp
	Reverse: 5' GGCCTGTAACGATGAG GTTTCT 3'			

Tabela 11: Genes de controles e citocinas, primers específicos, tamanho dos pares de bases e referência para protocolos de amplificação (Conclusão).

Gene	Primers (5'-3')	Reference	Location (nt)	Amplification (bp)
TLR4	Forward: 5'CGTGCAGGTGGTTCCT AACAT 3'	NM_001113 039.1	93-173	81 bp
	Reverse: 5'ACTGATGTGGGGATGT TGTCAG 3'			
TNF- α	Forward: 5'ACGTTGTAGCCAATGT CAAAGC 3'	NM_214022 .1	451- 549	98 bp
	Reverse: 5'CTGGTTGTCTTTCAGC TTCACG 3'			
IL1 β	Forward: 5'AAGTGGTGTTCAT GAGCTT 3'	NM_214055 .1	524- 643	120 bp
	Reverse: 5'TGGGCGTGTATCTTT CATCAC 3'			
IL2	Forward: 5'TGCTGCTGGATTTACA GTTGCT 3'	NM_213861 .1	110- 221	112 bp
	Reverse: 5'TTCAATTCTGTAGCCT GCTTGG 3'			

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Sinais Clínicos

Após a primeira dose da vacina, um suíno do G1 apresentou um pico de febre 8hrs após a vacinação. Sinais clínicos de febre e dispneia nos intervalos de 8hrs (5/7), 12hrs

(4/7), 32hrs (5/7), 48hrs (1/7) e 56hrs (2/7) foram observados somente nos suínos do G2. No local da aplicação um suíno do G1 apresentou um pequeno nódulo à palpação após a segunda dose da vacina, desaparecendo sete dias depois.

6.2.2 Lesões

Devido à severidade dos sinais clínicos observados, os suínos do G2 foram eutanasiados no terceiro e quarto dias após o desafio. Os demais suínos dos grupos G1 e G3 foram eutanasiados sete dias após o desafio conforme delineamento.

Os suínos do G1 apresentaram somente pequenos cistos no local da vacinação (Tabela 11). Os suínos do G3 (Controle negativo) não apresentaram sinais clínicos, nem alterações macro ou microscópicas.

As principais lesões de necropsia foram encontradas somente nos suínos do grupo G2, sendo pleurite fibrinosa, consolidação pulmonar mais evidente no lobo cardíaco direito, nódulos pulmonares necrohemorrágicos, observados com maior frequência na região ventral da face lobular do lobo cardíaco (figura 4), edema interlobular, pericardite fibrinosa, peritonite fibrinosa com exsudato seroso, e pequenos cistos no local da aplicação da vacina (Tabela 12).

Quanto as lesões microscópicas houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos quanto aos seguintes parâmetros: nódulo pulmonar necrohemorrágicos, linfadenite supurativa, pericardite fibrinosssupurativa, pleuropneumonia fibrinonecrótica, estas observadas somente no G2 (Tabela 13), e miosite granulomatosa leve com índices elevados no G1 (85,71%).

Tabela 12: Percentual de animais com reação vacinal no local de aplicação da vacina em cada grupo experimental.

Lesões macroscópicas	Vacinados			P
	G1- Al(OH) ₃ (n = 7)	G2- Cont. de infecção (n=7)	G3- Cont. negativo (n=4)	
Nódulo/Cisto no local da aplicação	28,57	0,00	0,00	0,3137
Miosite granulomatosa leve	85,71 ^a	14,29 ^b	0,00 ^b	0,0071
Total de suínos com alguma alteração em geral	100,0 ^a	14,29 ^b	0,00 ^b	0,0045

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;
Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Figura 4: Suíno do grupo G2 (controle de infecção): nódulo necrohemorrágico no bordo ventral lobo cardíaco.



Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Tabela 13: Alterações macroscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.

Lesões macroscópicas	Vacínados			P
	G1- Al(OH) ₃ (n = 7)	G2- Cont. de infecção (n=7)	G3- Cont. negativo (n=4)	
Consolidação pulmonar				
Lobo apical direito	0.00	14.29	0.00	1.0000
Lobo apical esquerdo	0.00	0.00	0.00	-
Lobo cardíaco direito	0.00	42.86	0.00	0.0907
Lobo cardíaco esquerdo	0.00	14.29	0.00	1.0000
Lobo diafragmático direito	0.00	14.29	0.00	1.0000
Lobo diafragmático esquerdo	0.00	0.00	0.00	-
Lobo intermediário	0.00	14.29	0.00	1.0000
Nódulo pulmonar necrohemorrágico	0.00 ^b	57.14 ^a	0.00 ^a	0.0415
Pleurite fibrinosa	0.00	42.86	0.00	0.0907
Edema interlobular	0.00	28.57	0.00	0.3137
Pericardite fibrinosupurativa	0.00	42.86	0.00	0.0907
Aumento de linfonodos Mediastínicos	0.00	0.00	0.00	-
Peritonite	0.00	14.29	0.00	1.0000
Total de suínos com alguma alteração em geral	0.00 ^b	71.43 ^a	0.00 ^b	0.0065

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;

Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

No linfonodo mediastínico observou-se infiltrado de neutrófilos moderado, multifocal, hemorragias e edema nas áreas subcapsulares e paratrabeculares, caracterizando uma linfadenite supurativa (figura5). Na pericardite fibrinossupurativa observava-se infiltrado acentuado de neutrófilos e, em menor número, de macrófagos, com acentuada exsudação fibrinosa na superfície, hiperplasia de tecido conjuntivo levando ao espessamento do pericárdio.

Tabela 14: Alterações microscópicas, em percentagem, observadas nos suínos nos diferentes grupos experimentais.

Lesões microscópicas	Vacinados			P
	G1- Al(OH) ₃ (n = 7)	G2- Cont. de infecção (n=7)	G3- Cont. negativo (n=4)	
Linfadenite supurativa	0.00 ^b	71.43 ^a	0.00 ^b	0.0065
Hepatite necrótica multifocal	0.00	28.57	0.00	0.3137
Pericardite fibrinossupurativa	0.00 ^b	57.14 ^a	0.00 ^b	0.0415
Pleuropneumonia fibrinonecrótica	0.00 ^b	57.14 ^a	0.00 ^b	0.0415
Pleuropneumonia fibrinossupurativa	0.00	14.29	0.00	1.0000
Total de suínos com alguma alteração em geral	0.00 ^b	100.0 ^a	0.00 ^b	0.0016

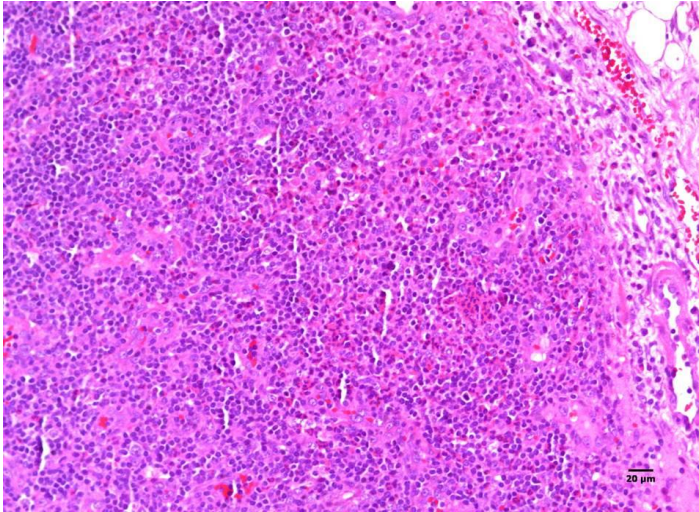
P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;

Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Quanto às lesões pulmonares, as consolidações observadas na macroscopia, na histologia correspondiam a infiltrado de neutrófilos acentuado e exsudação fibrinosa sobre a pleura e nos septos interlobulares, necrose de coagulação multifocal no parênquima alveolar, associado a edema, fibrina, infiltrado de neutrófilos degenerados acentuados, alguns na forma de “grão de aveia” e em menor número de macrófagos (Figura 6). Esta descrição histologia foi observada também nos nódulos necrohemorrágicos. Nas lesões pulmonares, quando o componente necrótico foi mais acentuado, a lesão era classificada como fibrinonecrótica (57,14%), naqueles casos em que o infiltrado neutrofílico sobressaía-se era denominado fibrinossupurativa (14,29 %).

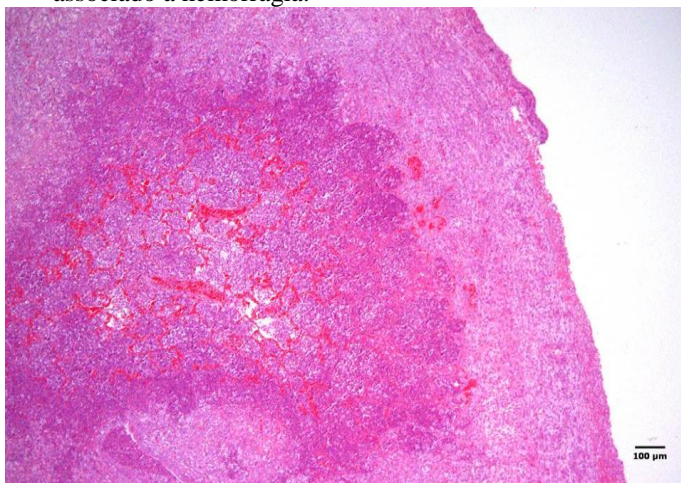
Figura 5: Suíno do grupo G2 (controle de infecção): Linfonodo mediastínico: infiltrado de neutrófilos moderado, multifocal.



Fonte: Produção do próprio autor (2014).

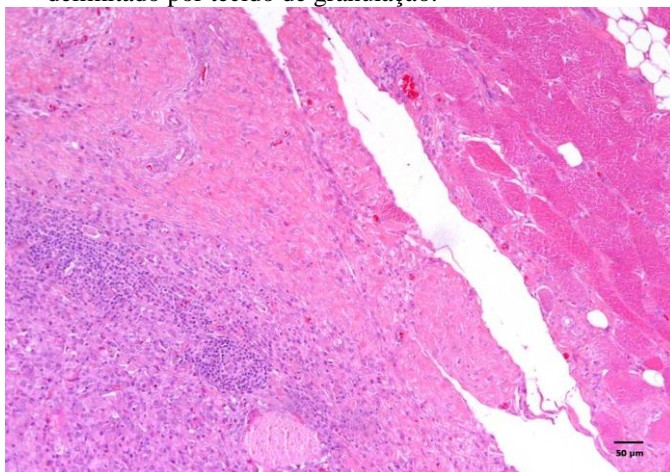
Miosite granulomatosa leve no local da aplicação da vacina foi frequente nos suínos do G1 com 85,71%. Na macroscopia essas lesões eram áreas arredondadas com aspecto sólido e na histologia formada por tecido de granulação, com acentuado infiltrado de macrófagos e alguns aglomerados linfóides entre as fibras musculares de limitados por tecido fibroso. Em algumas áreas havia espaços “vazios” intralesionais ou entremeados nas miofibras, que se devem provavelmente a localização de material residual do hidróxido de alumínio e ou calcificação, retirados durante o processamento da amostra (Figura 7).

Figura 6: Suíno do grupo G2 (controle de infecção): Pulmão caracterizado por: necrose de coagulação com infiltrado acentuado de neutrófilos degenerados e, em menor numero de macrófagos, associado a hemorragia.



Fonte: Produção do próprio autor (2014).

Figura 7: Suíno grupo G1 (vacinado): infiltrado acentuado de macrófagos e infiltrado linfocítico multifocal leve entre as fibras musculares, delimitado por tecido de granulação.



Fonte: Produção do próprio autor (2014).

6.2.3 Imunomarcção de *P. multocida*

As tonsilas apresentavam áreas de necrose na luz das criptas, com infiltrado moderado de eosinófilos. Nos grupos G1 e G2 houve 100% de marcação com intensidade moderada à elevada de *P. multocida* nas células das criptas como dispersas no citoplasma de macrófagos. No grupo G3 não foram observadas marcações e lesões nas tonsilas.

6.2.4 Reisolamento de *P. multocida*

A recuperação de *P. multocida* nos diferentes tecidos esta descrita na tabela 12. Houve diferença ($p \leq 0,05$) na recuperação da *P. multocida* entre os grupos. A maior frequência de reisolamento ocorreu no G2 (57,14%). A bactéria não foi recuperada nos animais dos grupos G1 (vacinados) e G3 (controle negativo).

Tabela 15: Percentual de animais com reisolamento de *P. multocida* no por grupo experimental (Continua).

Reisolamento bacteriológico	Vacinados			P
	G1- Al(OH) ₃ (n = 7)	G2- Cont. de infecção (n=7)	G3- Cont. negativo (n=4)	
Baço	0.00	14.29	0.00	1.0000
Fígado	0.00	14.29	0.00	1.0000
Linfonodo mediastínico	0.00	42.86	0.00	0.0907
Tonsila	0.00	0.00	0.00	-
Pulmão	0.00 ^b	57.14 ^a	0.00 ^b	0.0415
Líquido da cavidade peritoneal	0.00	0.00	0.00	-
Suabe do local da aplicação	0.00	0.00	0.00	-
Suabe nasal	0.00	0.00	0.00	-
Suabe de pericárdio	0.00	14.29	0.00	1.0000
Suabe de pleura	0.00	42.86	0.00	0.0907

Tabela 16: Percentual de animais com reisolamento de *P. multocida* no por grupo experimental (Conclusão).

Reisolamento bacteriológico	Vacinação			P
	G1- Al(OH) ₃ (n = 7)	G2- Cont. de infecção (n=7)	G3- Cont. negativo (n=4)	
Líquido da cavidade torácica	0.00 ^b	57.14 ^a	0.00 ^b	0.0415
Reisolamento bacteriológico geral	0.00 ^b	57.14 ^a	0.00 ^b	0.0415

P = nível descritivo de probabilidade do teste Exato de Fisher;

Porcentagens seguidas por letras distintas nas linhas diferem significativamente pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

6.2.5 Quantificação relativa da expressão de genes relacionados às respostas imunes

Dentre os quatro candidatos a gene de referência avaliados (GAPDH, Ubiquitin, Histone H3 e HPRT1), o gene HPRT1 apresentou melhores valores de estabilidade, e foi selecionado para normalização dos dados de expressão gênica desse experimento.

Os resultados da quantificação relativa da expressão de genes relacionados à resposta imune celular encontram-se na figura 8.

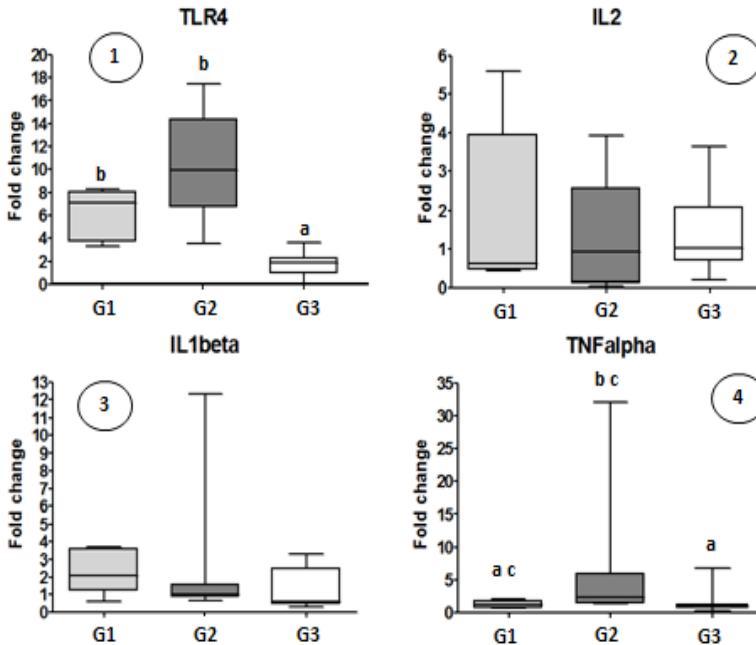
Foram observados aumentos significativos ($p < 0,05$) da expressão gênica de TLR 4, nos grupos desafiados com *P. multocida* (G1 e G2) quando comparados ao grupo controle negativo (G3). Embora os maiores níveis de expressão desse gene tenham sido observados no grupo G2, não foi observada diferença significativa entre este e o G1 ($p \geq 0,05$).

Para a quantificação de IL2, os maiores números foram observados nos G1 e para a IL1 β , os índices foram

maiores no G2, mas os aumentos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Em relação à quantificação do $\text{TNF}\alpha$, houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) da expressão gênica entre os grupos G2 e G3, sendo a expressão gênica observada no G1 foi semelhante aos demais.

Figura 8: Representação dos níveis de expressão gênica de TLR4 (1), IL2 (2), IL1 β (3) e $\text{TNF}\alpha$ (4) em amostras de sangue total provenientes de suínos experimentalmente desafiados com *P. multocida* previamente vacinados ou não, colhidas três dias após infecção.



Diferenças significativas pelo teste Dunn's Multiple Comparison estão representadas por letras diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Produção do próprio autor (2014).

6.3 DISCUSSÃO

O grupo controle de infecção (G2), como esperado, reisolou-se a bactéria e demonstrou os sinais clínicos característicos de pasteurelose pulmonar, sendo febre, dispnéia (respiração abdominal), e prostração (MARTÍN, et al., 2005; OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014), lesões macroscópicas como consolidação crânio ventral, nódulos pulmonares necrohemorrágicos, pericardite, peritonite com exsudato seroso (ONO et al., 2003, CAPPUCCIO, et al., 2004, KICH, et al., 2007, LÓPEZ, 2007, GOTTSCHALK, 2012, OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014), caracterizadas na histologia como, pleuropneumonia fibrinonecrótica e/ou fibrinossupurativa (KICH, et al., 2007, OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014). Estes resultados evidenciam a *P. multocida* utilizada no desafio como causa primária de doença respiratória em suínos (OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014). A diferença patológica encontrada entre os suínos desafiados com a mesma concentração de inóculo, provavelmente decorre da resposta de cada animal frente à infecção por *P. multocida*. No entanto, é possível que parte do inóculo tenha sido deglutido por alguns animais durante a inoculação e, com isso, a concentração bacteriana efetivamente inoculada pode ter sido menor da preconizada.

O grupo de suínos vacinados não apresentou lesões e reisolamento do agente, em relação ao grupo controle de infecção em que foi aplicado apenas o adjuvante. Estes dados evidenciam o efeito protetor de antígenos da *P. multocida* numa formulação com o corpo bacteriano completo contra a infecção experimental com amostra heteróloga da bactéria. Chanter & Rutter (1989) relatam efeitos benéficos com a utilização de bacterinas adicionadas de hidróxido de alumínio como adjuvante.

O grupo controle negativo (G3) não apresentou isolamento nem imunomarcção do agente. Nesse estudo, a

constatação do a agente na tonsila foi mais eficiente na marcação por IHQ do que no reisolamento bacteriano, indicando que a IHQ pode ser utilizada em estudos de prevalência para *P. multocida*.

A patogenia da *P. multocida* nas pneumonias de suínos, ainda não esta clara. Alguns autores associam a patogênese com as características moleculares de *P. multocida* (MAROIS, et al., 2009; PORS, et al., 2011). Uma estrutura importante na patogenia são os LPS de membrana, que induzem uma resposta inflamatória do hospedeiro e estimulam a resposta imune humoral. Um importante mediador desta linha de defesa são os receptores Toll-like (TLRs), que podem detectar e combater componentes extracelulares ou intracelulares (HILDEBRAND, et al., 2012). No nosso estudo, é notado o reconhecimento pelos TLRs, havendo aumento na expressão de TLR4, com diferença entre os animais desafiados e o grupo controle negativo. Resultados semelhantes foram descritos por Galdiero, et al. (2000) utilizando bactérias inteiras de *P. multocida* em bovinos.

Das duas citocinas pró-inflamatórias quantificadas, IL-1 β e TNF- α , houve maior expressão de TNF- α , com diferença ($p < 0,05$) entre os grupos controle de infecção e o controle negativo. IL-1 β não teve expressão significativa, indicando que para *P. multocida* a resposta imune é mediada por TNF- α . O aumento do TNF- α também foi observado em estudos de *P. multocida* em bovinos, contudo houve também a expressão significativa de IL-1 β (GALDIERO, et. al. 2000).

Os suínos apresentaram ainda uma tendência de resposta imune Th1, que elevam a produção de IL- 2, TNF- α , IFN- γ e de IgG (BALASSE, et al., 2008). A expressão IL2 no estudo não apresentou diferença entre os grupos, mas o maior nível de expressão foi observado no grupo vacinado.

6.4 CONCLUSÃO

1. A vacina de *P. multocida* produzida com adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ previniu a pasteurelose em suínos desafiados com uma cepa heteróloga daquela usada na vacina.
2. A resposta imune expressa pelos suínos foi mediada por TLR4, e $\text{TNF-}\alpha$.
3. A imunohistoquímica foi eficaz para marcação de *P. multocida* na tonsila.
4. A *P. multocida* comportou-se como agente primário nesse experimento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. v. 124, n. 4, p.783-801. Feb 2006.

BALASSE, E.; ODOT, J.; GATOUILLAT, G.; ANDRY, M,C.; MADOULET, C. Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. **Int J Pharm**. v. 2 n.1-2, p. 131-8. Apr 2008.

BARTELING, S. J.; VREESWIJK, J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. **Vaccine**, v. 9, p. 75-88, 1991.

BECHMANN, G.; SCHIMMEL, D.; ERLER, W.; SCHÖSS. Vaccination trials for protection against *Pasteurella* pneumonia. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: International Pig Veterinary Society, p.177. 1992.

BETHE, A.; WIELER, L.H.; SELBITZ, H,J.; EWERS, C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**. v. 139, n. 1-2, p. 97-105, 2009.

BIBERSTEIN, E. L; HIRSH, D. C; *Pasteurella*, In: Microbiologia veterinária; HIRSH, C. D; ZEE, Y. C; Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

BREWER, J.M., CONACHER, M., SATOSKAR, A., BLUETHMANN, H., ALEXANDER, J. (1996) In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses

equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. **European journal of immunology**. v. 26, n.9, p. 2062-2066. 1996.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. **Science**. v. 304, n. 5673, p.1014-1018. May 2004.

BOMFORD, R. Adjuvantes in veterinary vaccines. In: MOWAT, N.; RWEYEMAMU, M. **Vaccine manual: the production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, n.35, p. 277-284. 1997.

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

BOROWSKI, S.M.; IKUTA, N.; LUNGE, V.; FONSECA, A.; MARQUES, E.; CARDOSO, M. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 97-103, 2002.

CAPPUCCIO, J., LEOTTA, G.A., VIGO, G., MOREDO, F., WOLCOTT, M.J., PERFUMO, C.J. Phenotypic Characterization of *Pasteurella multocida* Strains isolated from pigs with broncho and pleuropneumonia. In.: International Pig Veterinary Society Congress, 18th, 2004, Hamburg/Germany. **Proceedings...** v.1, p.205. 2004.

CHANTER, N. & RUTTER, J.M. (1989). Pasteurellosis in pigs and the determinants of virulence of toxigenic *Pasteurella multocida*. In: **Pasteurella and Pasteurellosis**, Adlam, C. and Rutter, J.M. (editors) London: Academic Press, p. 161–195. 1989.

COFFMANN, R.L., SHER, A., SEDER, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**. V.33 492–503. 2010.

COX, J.X.; COULTER, A.R. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v.15, n.3, p.248-256, 1997.

EDELMAN, R. Vaccine Adjuvants. **Review of Infection Diseases**, v. 2, p. 370-383, 1980.

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. **Veterinary Microbiology**. v. 31, p. 304–317. May 2006.

FALK, K. et al. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 32, n. 1, p. 67-77, 1991.

GALDIERO, M.; FOLGORE, A.; NUZZO, I.; GALDIERO, E. Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells in vitro by protein H and LPS

of *Pasteurella multocida*. **Immunobiology**. v.202, n. 3, p. 226-238. Sep 2000.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, p. 293-306, 1993.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvant for human vaccines- current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p. 1263-1276, 1995.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu Ver Immunol**. v.20, n. 6, p.21-67 . 2002.

GOTTSCHALK M: **Actinobacillosis** In: Zimmerman, JJ, Karriker, LA, Ramirez, A, Schwartz, KJ, Stevenson, G. W (EdS), *Diseases of swine* 10th ed, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, p. 653-669. 2012.

HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E.M.; NIELSEN, O.L. An investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark, **Journal of Comparative Pathology**, 2010.

HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. *Pasteurellamultocida* pathogenesis:125 years after Pasteur. Federation of European Microbiological Societies.**FEMS Microbiology Letters**, v. 265, p. 1–10, 2006.

HERES, T.S. **Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos.** 2009, Porto Alegre, Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

HILDEBRAND, D.; SAHR, A.; WÖLFLE, S.J.; HEEG, K.; KUBATZKY, K.F. Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through *Pasteurella multocida* toxin-induced Gprotein signalling. **Cell Communication and Signaling.** v. 10, n. 22, Aug, 2012.

HILLEMANN, M. R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccine. **Progress in Medical Virology**, v. 8, p. 131-182, 1966.

HOGENESCH, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. **Vaccine.** v.20, p. 34-39. 2002.

HOIE, S. et al. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 32, n. 3, p. 395-402, 1991.

HONNOLD, C. **Porcine respiratory disease complex.** Ergomix, 2009. Disponível em <<http://en.engormix.com/MA-pig-industry/health/articles/porcine-respiratory-disease-complex-t1378/165-p0.htm>>. Acesso em 15/04/2015.

JIRAWATTANAPONG, P.; STOCKHOFF-ZURWIEDEN, N.; LEENGOED, L.V.; WISSELINK, H. RAYMAKERS, R.; CRUIJSEN, T.; PEET-SCHWERING, C.V.; NIELEN, M.;

NES, A.V. Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis.

Research in Veterinary Science. v. 88, p. 11–15, 2010.

JORDAN, D., HOFFMAN, L.; THACKER, E. *Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex (PRDC). **American Association Of Swine Veterinarians**, p. 149-152, 2006.

KICH, J. D. ; MORES, N. ; TRIQUES, N. ; NOGUEIRA, M. G. ; LOCATELLI, C. ; KLEIN, C. S.; FELICIO, R. P. A *Pasteurella multocida* tipo A atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? **Comunicado Técnico n. 469**, Embrapa Suínos e Aves Concórdia, p. 7. 2007.

KICH, J.D., KUCHISHI, S.S., MORES, M.A.Z., LARA, A.C. Agentes bacterianos de pneumonia associados a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: SINSUI – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA – PRODUÇÃO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 5, 2010, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS, p.17-25. 2010.

KIM, J. et al. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v. 166, p. 251-256, 2003.

KORSHOLM, K.S., PETERSEN, R.V., AGGER, E.M., ANDERSEN, P. T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection.

Immunology. v.129, n.1, p. 75-86. 2009.

KUBATZKY, K. F. *Pasteurella Multocida* and Immune Cells. In: AKTORIES, K.; ORTH, J.H.C.; ADLER, B. *Pasteurella Multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*. Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 361, p. 53-72. 2012.

LÓPEZ, A. Respiratory System. In:McGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. (Eds.) **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. St. Louis: Mosby, p. 463-558. 2007.

MAROIS, C.; FABLET, C.; GAILLOT, O.; MORVAN, H.; MADEC, F.; KOBISCH, M. Molecular diversity of porcine and human isolates of ***Pasteurella multocida***. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1830-1836, 2009.

MARTÍN, C.B.G.; LIZARAZO, Y.A.V.; GONZÁLEZ, M.L.; FERRI, E.F.R. Procesos producidos por *Pasteurella multocida*. **SUIS**, v. 14, n.1, 2005.

MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; THACKER, B.J. Potentiating effect of adjuvants on humoral immunity to porcine parvovirus vaccines in guinea pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 209-218, 1985.

MORES, M. A.Z. Pneumonias em Suínos. In: ALBERTON, G.C.; ZOTTI, E. (Org.) **Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos**. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, p. 13-82. 2010.

MORES, M. A. Z. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos**. 2006. Curitiba, Dissertação (Mestrado) -

Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA FILHO, J.X., 2014. **Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Porto Alegre/RS. 2014.

OKINO, C. H., 2010. **Imunidade celular e humoral no trato Respiratório de galinhas desafiadas com o Vírus da bronquite infecciosa e efeito de Subdosagens da vacina na indução de Proteção.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP. Jaboticabal/SP. 2010.

ONO, M., OKADA, M., NAMIMATSU, T., FUJII, S., MUKAI, T., SAKANO, T. Septicaemia and arthritis in pigs experimentally infected with *Pasteurella multocida* capsular serotype A. **Journal of Comparative Pathology** 129, 251–258. 2003.

OPRIESSNIG, T. et al. Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 591-615, 2007.

PATIL, P. K.; BAYRY, J.; RAMAKRISHNA, C.; HUGAR, B.; MISRA, L. D.; NATARAJAN, C. Immune response of goats against foot-and-mouth disease quadrivalent vaccine: comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide

gel vaccines in eliciting immunity. **Vaccine**, v. 20, p. 2781-2789, 2002.

PIJOAN, C. Pneumonic pasteurellosis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 9.ed. Ames: Blackwell Publishing, p.719-726. 2006.

PORS S.E., HANSEN M.S., BISGAARD M., JENSEN H.E.: Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Vet Microbiol** v. 150. p.160-166. 2011.

PRETO, A. A.; FERNANDES, M.J. *et al.* - Preparação da vacina anti-rábica PV/BHK em emulsão oleosa e avaliação do poder imunogênico em bovinos. **Arq Biol Tecnol** v.34 p.609-16. 1991.

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGEN, P. J. *Pasteurella* species, Mannheimia haemolytica and Bibersteiniatrehalosi. In: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2. ed. **Ames, Iowa, Wiley-Blackwell**, cap. 27, p. 300–308. 2011.

REGISTER, K. B.; BROCKMEIER, S. L.; de JONG, M. F.; PIJOAN, C. Pasteurellosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L. A.; RAMIRES, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Eds.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, p. 798-810. 2010.

RESENDE, F.C.B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S.I.A.C.; ZANETTI, C.R.; LIMA, H.C. Adjuvantes de vacinas:

possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v. 27, n.3, p.116-24. 2004.

ROMANI, L., BISTONI, F., PUC CETTI, P. Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. **Chemical immunology**. v.68. p.110-135. 1997.

SABATTÉ, J.; MAGGINI, J.; NAHMOD, K.; AMARAL, M.M.; MARTÍNEZ, D.; SALAMONE, G.; CEBALLOS, A.; GIORDANO, M.; VERMEULEN, M.; GEFFNER; J. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 18, n. 1-2, p.5-17. Feb-Apr. 2007.

SMITH, R.E., DONACHIE, A.M., MCLAREN, F.H., MOWAT, A.M. Preservation of mucosal and systemic adjuvant properties of ISCOMS in the absence of functional interleukin-4 or interferon-gamma. **Immunology**. v.93, n.4. p. 556-562. 1998.

SMITH, I. M.; BETTS, A. O.; WATT, R. G.; HAYWARD, A. H. S. Experimental infections with *Pasteurellaseptica* (serogroup A) and an adeno or enterovirus in gnotobiotic piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v. 83, p. 1–1, 1973.

SCHIJNS, V.E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. **Current opinion in immunology**. v.12, n.4. p.456-463. 2000.

SEPPIC, Montanide and Montanide ISA adjuvants for vaccines. **Seppic Technical Bulletin**, SEPPIC, Paris, 1994.

SINGH, M. Vaccine adjuvants and delivery systems. **John Wiley & Sons, Inc.** 2007.

SORENSEN, V. et al. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, B. E. et al. (Eds.). **Diseases of swine**. 9. ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2006. cap. 7, p. 149 – 178.

STEPAN, A.L. **Tipificação e sensibilidade de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas a partir de lesões de pleurite em suínos terminados**. 1995. 71p. Dissertação (Mestrado em Produção e Sanidade de Suínos) -, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

TANG, X.; ZHAO, Z.; HU, J.; WU, B.; CAI, X.; HE, Q.; CHEN, H. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurellamultocida* Strains from Swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 951–958, 2009.

THACKER, E. L. **Mycoplasmal Diseases**. In: STRAW, B.E et al. (eds.). Diseases of swine. 9. ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2006. cap. 42, p. 701 – 718.

TOWNSEND, K.M.; HANH, T. X.; O'BOYLE, D.; WILKIE, I, PHAN, T.T.; Wijewardana, T.G., Trung, N.T., Frost, A.J. PCR detection and analysis of *Pasteurellamultocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v. 72,p.69–78, 2000.

UCHI, H., TERAHO, H., KOGA, T., FURUE, M. (2000) Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of dermatological science**, v.24, n.1, p.29-38. 2000.

UNDERHILL, D.M. Toll-like receptors: networking for success. **Eur J Immunol**. V. 33, n. 7, p. 1767-1775. Jul 2003.

VAHLE, J.L.; HAYNES, J.S.; ANDREWS, J.J. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings **J Vet Diagn Invest** 1995, 7:476–480.

WILLIAMS, I.R., KUPPER, T.S. (1996) Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life sciences**. v. 58, n.18 p.1485-1507. 1996.

YAMAGUTI, M.; MULLER, E.E.; PIFFER, A.I.; KICH, J.D.; KLEIN, C.S.; KUCHIISHI, S.S. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problem. **Braz J Microbiol**. V. 39, p. 471-47. 2008.