

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

**ESTABELECIMENTO DE UM ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM
CAMUNDONGOS PARA CEPAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE AVES E
SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado

Brunna Dias de Emery

**PORTO ALEGRE
2016**

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

**ESTABELECIMENTO DE UM ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM
CAMUNDONGOS PARA CEPAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE AVES E
SUÍNOS**

Autora: Brunna Dias de Emery

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Sanidade Avícola**

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

**PORTO ALEGRE
2016**

CIP - Catalogação na Publicação

Emery, Brunna Dias de

Estabelecimento de um índice de patogenicidade em camundongos para cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves e suínos / Brunna Dias de Emery. -- 2016.

71 f.

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *pasteurella multocida*. 2. Índice . 3. patogenicidade. 4. camundongos. 5. aves e suínos. I. Moraes, Hamilton Luiz de Souza , orient. II. Título.

Brunna Dias de Emery

ESTABELECIMENTO DE UM ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM
CAMUNDONGOS PARA CEPAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE AVES E
SUÍNOS

Aprovada em 03 MAR 2016

APROVADO POR:

Prof. Dr Hamilton Luiz de Souza Moraes

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito

Membro da Comissão

Prof. Dr. Luís Cesar Bello Fallavena

Membro da Comissão

MV. Dr. Thales Quedi Furian

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por mais uma conquista em minha vida. Alhamdulillah.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Ricardo e Eliene, que mesmo com todas as dificuldades vividas, sempre priorizaram a educação dos filhos.

Agradeço ao meu esposo Irfan, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me enchendo de palavras positivas.

Ao meu orientador Prof. Hamilton Luiz de Souza Moraes, pela calma, amizade e disponibilidade em todas as etapas.

Ao Prof. Carlos Tadeu Pippi Salle por me fazer refletir sobre os problemas da pesquisa.

Ao colega Thales Quedi Furian pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar a qualquer momento.

Ao Dr. Benito Guimarães de Brito pela acessibilidade e disponibilização do local para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Lucas Brunelli de Moraes e ao Leandro, pelo auxílio prestado no Biotério experimental do IPVDF-Fepagro.

Às amigas queridas, Flávia Nunes, Gabriela Zottis e Juliana Herpich pelas muitas risadas e chimarrões.

Aos colegas do CDPA, Luísa Neukamp, Roberta Pillati, Flávia Fortes, Mariana Paravisi, Rafaela Morgan, Daiane Carvalho, Caroline Hiller, Juliana Bassani, Sara Gehlen, Suelle Vencato, Rafaela Menezes, Gabriela Siqueira, Tiago Müller, Karen Borges, Daniela Tonini, Silvio Rocha e Omar Pereira, pela ajuda prestada.

RESUMO

Entre as doenças que podem trazer prejuízos à avicultura brasileira, destaca-se a cólera aviária (CA), uma doença contagiosa resultante da infecção pela bactéria *Pasteurella multocida*. Outras importantes enfermidades causadas pelo agente são a rinite atrófica progressiva em suínos, septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos e pasteurelose em coelhos. Infecções em humanos parecem não ser tão frequentes, entretanto casos associados principalmente a mordeduras e/ou arranhaduras de cães e gatos já foram relatados. *P. multocida* está amplamente distribuída entre as espécies animais, mas pouco se conhece sobre a patogênese e especificidade a diversos hospedeiros. Muitos dados gerados a partir de metodologias de avaliação de patogenicidade podem ser subjetivos e pouco mensuráveis, pois geralmente envolvem apenas a observação da capacidade letal do agente em inoculações experimentais. Devido à falta de dados mais consistentes, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo de classificação da patogenicidade de *P. multocida* isolada de aves e suínos, através da inoculação em camundongos. Foram utilizadas 94 cepas de *P. multocida* originárias de casos de cólera aviária e pulmões de suínos ao abate. Um volume de 0,1 mL obtido da concentração de 10^6 UFC/mL de cada isolado foi inoculado por via intraperitoneal nos camundongos. O período de observação, estabelecido a cada 6 horas, foi um critério importante na determinação de índices de patogenicidade (IPs) mais ajustados. Além da mortalidade observada neste período, outras variáveis foram consideradas, como o tempo de morte e as lesões macroscópicas. Os IPs obtidos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) conforme a origem das cepas. Da mesma forma, o número de lesões macroscópicas observadas e o percentual de isolamento foram distintos ($p < 0,05$) entre as cepas de aves e de suínos. A partir dos índices observados, os isolados foram agrupados em três classes de patogenicidade: alta, média e baixa. O estudo propôs uma metodologia consistente de mensuração e classificação da patogenicidade de *P. multocida* e os resultados obtidos servirão para gerar outros modelos mais ajustados, bem como base para o diagnóstico da doença.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, índice de patogenicidade, camundongos.

ABSTRACT

Among the diseases that can bring harm to the Brazilian poultry industry, there is Fowl Cholera (FC), a contagious disease resulting from infection by the bacterium *Pasteurella multocida*. Other important diseases caused by the agent are progressive atrophic rhinitis in swine, haemorrhagic septicemia in cattle and buffalo, and pasteurellosis in rabbits. The infections in humans do not appear so frequently, however the cases mainly associated with bite and/or scratching of dogs and cats have been reported. *P. multocida* is extensively distributed among animal species, but little is known about the pathogenesis and specificity to various hosts. Many reported data generated from pathogenicity evaluation methods can be subjective and little measurable, because usually only involve the observation of the lethal capacity of the agent in experimental inoculation. Due to lack of more consistent data, this study aims to establish a classification model of *P. multocida* pathogenicity that is isolated from poultry and swine by inoculation of mice. There were used 94 strains of *P. multocida* originating from fowl cholera and slaughter swine lungs. A volume of 0.1 mL obtained from the concentration of 10^6 UFC/mL was inoculated by intraperitoneally route in five mice. The observation period established every six hours was an important criterion in determining pathogenicity index (PIs), further adjusted. In addition to the mortality observed in this period, other variables were considered as the time of death and gross lesions. The PIs obtained showed significant differences ($p < 0,05$) according to the origin of the strains. Likewise, the number of gross lesions and isolation percentages were different ($p < 0,05$) among strains of poultry and swine. From the observed ratios, the isolates were grouped into three pathogenicity classes: high, medium and low. This study has proposed a consistent measurement and classification of *P. multocida* pathogenicity and the obtained results will be used to generate other adjusted models f, as well as the basis for disease diagnosis.

Keywords: *Pasteurella multocida*, pathogenicity index, mice.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Alojamento dos camundongos em caixas experimentais e distribuição das caixas na sala de isolamento.....	32
FIGURA 2 -	Inoculação por via intraperitoneal dos camundongos.....	35
FIGURA 3 -	Lesões macroscópicas observadas nos camundongos necropsiados após inoculação com as cepas de <i>Pasteurella multocida</i> selecionadas...	36
FIGURA 4 -	Isolamento de <i>Pasteurella multocida</i> em Ágar Sangue e testes de catalase e oxidase.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Relação percentual entre a mortalidade e o período de morte avaliado (7 dias) para o total de camundongos inoculados independentemente da origem das cepas.....	42
GRÁFICO 2 -	Relação percentual entre a mortalidade e o período de morte avaliado (7 dias) para o total de camundongos inoculados conforme a origem das cepas.....	43
GRÁFICO 3 -	Relação percentual entre a mortalidade e o período de morte avaliado (168 horas) para o total de camundongos inoculados.....	44
GRÁFICO 4 -	Frequência de lesões macroscópicas e percentual de reisolamento conforme a origem das cepas de <i>Pasteurella multocida</i>	46
GRÁFICO 5 -	Distribuição das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de acordo com a origem nos grupos de patogenicidade.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Relação entre o tempo de morte e o valor atribuído ao Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) e relação entre o número de lesões e o respectivo valor atribuído.....	38
TABELA 2 -	Representação da execução do cálculo do Índice de Patogenicidade (IP) por cepa de <i>Pasteurella multocida</i> inoculada em camundongos.....	40
TABELA 3 -	Relação entre o percentual de reisolamento bacteriano e o dia de reisolamento das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> inoculadas em camundongos.....	49
TABELA 4 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a origem das cepas de <i>Pasteurella multocida</i>	50
TABELA 5 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das cepas de origem aviária nos grupos de patogenicidade.....	52
TABELA 6 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das cepas de origem suína nos grupos de patogenicidade.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AS	Ágar Sangue
BHI	<i>Brain- Heart Infusion</i>
CA	Cólera Aviária
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DL ⁵⁰	Dose Letal para matar 50% dos animais
DP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	Fator de Bonificação de Sobrevida
GAG's	Glicosaminoglicanos
IP	Índice de Patogenicidade
IPi	Índice de Patogenicidade Individual
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LPS	Lipopolissacarídeos
kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
N°	Número
OMP	<i>Outer Membrane Proteins</i>
pi	Pós inoculação
PC	Pericardite
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
CONJ	Conjuntivite
FH	Fígado hemorrágico
PH	Pulmão hemorrágico
PT	Peritonite
LI	Lesão inflamatória no local da aplicação
TM	Tempo de Morte

UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Histórico da bactéria <i>Pasteurella multocida</i>	17
2.2	Classificação	18
2.3	Características de cultura e identificação.....	19
2.4	Cólera aviária.....	20
2.5	Patogenia.....	22
2.6	Sinais clínicos	23
2.7	Lesões macroscópicas.....	24
2.8	Diagnóstico	25
2.9	Fatores associados à virulência.....	26
2.9.1	Cápsula.....	26
2.9.2	Lipopolissacarídeo (LPS).....	27
2.9.3	Fímbrias, adesinas e proteínas de membrana externa (OMPs).....	28
2.9.4	Toxina dermonecrótica	28
2.10	Estudos de patogenicidade.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Comitê de ética no uso de animais.....	32
3.2	Local de estudo	32
3.3	Aquisição e manutenção dos camundongos	32
3.4	Amostras	33
3.5	Dose letal 50%	34
3.6	Preparo do inóculo	34
3.7	Inoculação	35
3.8	Mortalidade, lesões macroscópicas e reisolamento bacteriano.....	36
3.9	Cálculo do índice de patogenicidade	38
3.10	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Mortalidade e tempo de morte avaliado.....	42

4.2	Sinais clínicos, alterações patológicas e reisolamento bacteriano	46
4.2.1	Sinais clínicos.....	45
4.2.2	Alterações patológicas e reisolamento bacteriano.....	45
4.3	Índices de patogenicidade	51
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APENDICE A – Protocolo de aprovação CEUA/IPVDF.....	66
	APENDICE B – Distribuição das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> e seus respectivos índices de patogenicidade.....	67
	APENDICE C – Origem, condições do hospedeiro e ano de isolamento das 94 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> selecionadas para o estudo.....	68

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola tem como base um sistema complexo e dinâmico, onde a ação conjunta de manejo, nutrição, genética e sanidade mantiveram o Brasil até 2014 na posição de terceiro maior produtor de frangos do mundo, perdendo apenas para Estados Unidos e China. Além disso, o País está em primeiro lugar em exportação, por possibilitar um volume significativo de proteína de origem animal, em curto prazo de tempo e com baixo custo de produção (AMARAL, 2014).

Já em 2015 a produção brasileira de carne de frango aumentou significativamente, totalizando 13,146 milhões de toneladas, de acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), volume este 3,58% superior ao registrado no ano de 2014. Com isso, o Brasil consolidou-se como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, superando a China (ABPA, 2016).

Segundo o relatório anual da União Brasileira de Avicultura (UBABEF), do volume total de frangos produzido pelo país em 2013, 68,4% foi destinado ao mercado interno e 31,6% para o mercado externo. Com isto, o consumo per capita de carne de frango foi de 41,80 kg/habitante/ano, número que representa uma diminuição de 3,2 kg em relação ao ano anterior (UBABEF, 2014). Além do elevado consumo anual de carne de aves, o setor gerou em 2014 40 mil empregos diretos, 800 mil atividades indiretas e representou fonte de renda para 10 mil famílias de produtores integrados à atividade no Estado do Rio Grande do Sul (FIOREZE, 2014).

Nesta posição de destaque, a produção avícola possui hoje um importante papel sócio econômico, o que faz necessário uma atenção mais detalhada no que diz respeito à saúde dos plantéis. O crescimento econômico das indústrias está inteiramente relacionado com o aumento no tamanho dos sistemas de produção, bem como com o aumento da densidade animal em uma determinada área geográfica. O grande problema está na promoção de condições favoráveis para a multiplicação, disseminação e perpetuação de vários patógenos de aves, especialmente se as medidas de biosseguridade forem negligenciadas (SESTI, 2004). A biosseguridade consiste em uma série de procedimentos

realizados na granja com a finalidade de garantir a saúde dos plantéis, promovendo maior produtividade e assegurando um produto saudável para o consumidor (HUNKA, 2015).

Entre as doenças que podem trazer prejuízos à avicultura brasileira, encontra-se a cólera aviária (CA), uma doença contagiosa resultante da infecção pela bactéria *Pasteurella multocida* (CHRISTENSEN E BISGAARD, 2000; KONEMAN, 2008). Outras importantes enfermidades decorrentes da infecção pelo mesmo agente incluem a rinite atrófica progressiva em suínos, a septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos e a pasteurelose em coelhos (ALWIS, 1992; AVANTE, 2008; KONEMAN, 2008).

P. multocida é um habitante comensal do trato respiratório e digestivo de animais saudáveis que pode estar presente em mamíferos e aves sem causar doenças (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006), entretanto pode subitamente demonstrar patogenicidade, caso o hospedeiro esteja exposto a fatores que irão desequilibrar seu sistema imunológico, tais como estresse, mudanças ambientais ou infecções intercorrentes (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

O diagnóstico confirmatório da doença e a detecção de *P. multocida* dependem do isolamento e da identificação do organismo suspeito. Geralmente se utilizam modelos animais, como camundongos, para a confirmação do diagnóstico, no entanto, devido aos custos de manutenção, à necessidade de treinamento para a manipulação dos animais, além da questão do bem-estar animal, novas alternativas para estas metodologias são necessárias.

Apesar do número de doenças que essa bactéria está envolvida e o impacto econômico associado a essas enfermidades, tanto o conhecimento sobre a patogenia quanto da virulência dessas cepas ainda é considerado pequeno (WILKIE *et al.*, 2012).

Muitas metodologias de avaliação de patogenicidade envolvem apenas a observação da capacidade letal do agente, fornecendo dados subjetivos a respeito da capacidade patogênica das bactérias. Devido à falta de dados mais consistentes, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo de classificação da patogenicidade de *P. multocida* isoladas de aves e suínos, através da inoculação em camundongos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da bactéria *Pasteurella multocida*

Os estudos referentes à doença iniciaram-se na França, por Chabert em 1782 e o termo cólera aviária passou a ser utilizado por Maillet a partir de 1836. (NASCIMENTO *et al.*, 2009), em virtude do aparecimento da doença de forma súbita nas aves, juntamente com diarreia e elevadas taxas de mortalidade entre as aves (ANDREATTI FILHO, 2007).

Benjamin, em investigações mais profundas, demonstrou em 1851 que a doença poderia ser disseminada por coabitação, com isso o pesquisador deu início à formulação de procedimentos para sua prevenção. No mesmo período, Renalt, Reynal e Delafond demonstraram a transmissibilidade a várias espécies animais através de inoculação (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008).

Em 1886, Huppe fez referência a septicemia hemorrágica e em 1900 o termo pasteurelose aviária foi usado por Lignieres. Em 1877, Perroncito na Itália e em 1878 Semmer na Rússia observaram uma bactéria de forma arredondada que ocorria tanto sozinha como em pares nos tecidos de aves lesados pela doença. Em 1879, Toussaint constatou a relação da bactéria com a doença através do seu isolamento (NASCIMENTO *et al.*, 2009; ANDREATTI FILHO, 2007).

Contudo, bactérias do gênero *Pasteurella* foram reconhecidas como organismos causadores de doenças apenas em 1880 quando Louis Pasteur estabeleceu a *P. multocida* como o agente etiológico da cólera aviária, com isso o gênero *Pasteurella*, designado em sua homenagem, passou a ser utilizado. (REGISTER *et al.*, 2012). Além disso, Pasteur foi uma grande referência para o desenvolvimento de novos conceitos de imunidade e vacinação por ter comprovado em seus estudos a eficácia de cepas atenuadas na imunização contra a doença (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.2 Classificação

Atualmente a família *Pasteurellaceae* é compreendida por 10 gêneros, entre eles *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus* e o novo gênero *Avibacterium*, sendo classificadas como microrganismos relacionados após a realização de diversos estudos moleculares (NASCIMENTO *et al.* 2009).

Os tipos (ou sorogrupos) de *P. multocida* são identificados com base nas diferenças dos polissacarídeos capsulares (CARTER, 1955) e são designados A, B, D, E e F. Os microrganismos são adicionalmente subdivididos em 16 tipos somáticos com base nas diferenças sorológicas dos lipopolissacarídeos da parede celular (HEDDLESTON, 1972).

Os sorotipos A e D geralmente estão envolvidos com hospedeiros aviários, porém a subespécie *multocida* e o sorogrupo A geralmente encontram-se associados em formas severas de cólera aviária (NASCIMENTO *et al.*, 2009; BISGARD, 2008).

Os tipos capsulares A, B, D e F já foram detectados em infecções em suínos, entretanto o sorotipo mais frequentemente relatado nesta espécie e que aparece relacionado aos casos de pneumonia é o A, embora nos últimos anos tenha havido um aumento no aparecimento do tipo D, relacionado a casos pneumônicos (BOROWSKI *et al.*, 2007).

Tanto antígenos capsulares como somáticos são usados para designar um sorotipo específico. Os métodos sorológicos para estabelecimento dos tipos capsulares e somáticos incluem testes de aglutinação e de ágar gel difusão. Um teste de hemaglutinação indireta pode ser usado para identificação de antígeno capsular (QUINN, 2005).

Através de um estudo de prevalência no Egito, Mohamed *et al.* (2012) isolaram *P. multocida* em 21 (7,6%) galinhas de quintal, do total de 275 analisadas. Todos os isolados foram confirmados através de caracterização fenotípica. A sorotipagem somática resultou em 12 isolados de sorotipo A:1 (57,14%), 4 pertencentes ao sorotipo A:3 (19,05%) e 5 não foram tipificados. Ainda, os resultados da PCR mostraram que o tipo capsular A foi o mais encontrado em 85,7% das amostras, seguido pelo tipo capsular D (14,3%).

A biotipagem de *P. multocida* é ocasionalmente realizada em investigações epidemiológicas, mas em geral não é utilizada para diagnóstico. Três subespécies de *P. multocida* são reconhecidas: *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica*, *P. multocida* subsp. *gallicida* (QUINN, 2005) e recentemente foi descrita a subsp. *tigris* (CAPITINI, *et al.*, 2002).

2.3 Características de cultura e identificação

As espécies de *Pasteurella* são pequenos bacilos ou cocobacilos gram-negativos, de aproximadamente 0,2 x 1 a 2 mm e imóveis. Seu ótimo crescimento ocorre a 37°C, com um pH de 7,2 a 7,8. São oxidase-positivos e anaeróbios facultativos, sendo que a maioria das espécies é catalase-positiva (QUINN, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2009). A coloração de esfregaço de sangue ou tecidos através de técnicas como Giemsa ou Wright resultam na observação de células com coloração bipolar típica (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008). O microrganismo não cresce em ágar MacConkey (KONEMAN, 2008) e embora cresça em meios não enriquecidos, o melhor crescimento ocorre em meios suplementados com sangue ou soro (NASCIMENTO *et al.*, 2009), entretanto sua viabilidade em placas de cultura dure poucos dias (QUINN, 2005).

As colônias caracterizam-se por serem arredondas, de coloração acinzentada, brilhantes e não-hemolíticas. Linhagens patogênicas apresentam colônias mucoides devido à produção de espessa cápsula de ácido hialurônico. Outra característica que pode ser observada é um odor característico adocicado, diferenciando-se de outras espécies inodoras (QUINN, 2005; REGISTER *et al.*, 2012).

O odor característico produzido por este microrganismo talvez esteja associado a grande formação de indol. *P. multocida* é oxidase-positiva, catalase positiva, ornitina descarboxilase-positiva, indol-positiva e urease-negativa. Ainda, o agente produz ácido a partir de glicose, sacarose, manitol, mas não a partir de maltose ou lactose (KONEMAN, 2008, KUMAR, 2012). A diferenciação das subespécies de *Pasteurella* também pode ser

feita através do teste de fermentação de dulcitol e sorbitol, apresentando-se negativa para dulcitol e positiva para sorbitol (MUTTERS *et al.*, 1985 *apud* CHRISTENSEN, 2006).

Para a detecção de cápsula, principal fator de virulência de *P. multocida*, utiliza-se um tipo de tinta (nanquim), e ao microscópio se observa o centro da célula escuro e sua extremidade (cápsula), mais clara (MADIGAN *et al.*, 2010).

O isolamento do microrganismo pode ser realizado a partir de lesões locais, fígado, sangue de aves mortas e medula óssea (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Ágar sangue suplementado com 5% de sangue ovino ou bovino pode ser utilizado. Ágar amido dextrose e ágar tripcase de soja também são recomendados para o isolamento do microrganismo (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000).

Apesar da existência de meios seletivos, a inoculação em camundongos ainda representa o método de diagnóstico mais sensível para a identificação do agente (MUHAIRWA; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000). Isso acontece porque essa espécie é muito suscetível à infecção pela bactéria e atua como uma forma de filtro biológico para o microrganismo (PIJOAN, 1999).

2.4 Cólera aviária

A pasteurelose aviária ou cólera aviária é uma doença sistêmica altamente contagiosa, cujo agente causador é a *P. multocida*, que pode afetar tanto aves domésticas quanto selvagens. A doença geralmente resulta em uma alta mortalidade e morbidade e é uma das mais importantes por causar grandes prejuízos econômicos em todo o mundo (WILKIE *et al.*, 2012).

A doença aguda está entre os diferenciais de enfermidades com notificação obrigatória como a influenza aviária e doença de Newcastle (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008), sendo também uma grande preocupação para a avicultura industrial devido a fatores de disseminação comumente presentes. Exemplos destes fatores são a alta concentração de unidades de produção, alta densidade populacional nos aviários,

baixos níveis de biossegurança, além de vetores próximos às granjas (AMARAL, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

A maioria das espécies deste gênero habita normalmente as vias aéreas de animais domésticos, entretanto podem invadir os tecidos de animais imunodeficientes. (MUHAIRWA; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000; QUINN, 2005; WILKIE *et al.*, 2012). Tipicamente a doença ocorre na forma aguda, em que os animais morrem rapidamente por septicemia geralmente dentro de 24 a 48 horas (FRIEND; FRANSON, 1999). Quando há presença de sinais, podem ser observadas petéquias nas mucosas e serosas de diversos órgãos (CHARLTON *et al.*, 2006). A doença pode persistir na forma crônica, produzindo quadros edematosos de pneumonia, artrite e inflamação nas barbelas (BACK, 2004).

Muitas espécies animais carregam o agente, porém nem todas as cepas encontradas nesses hospedeiros afetam aves (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Ferramentas moleculares desenvolvidas para compreender melhor a biologia e patogênese desse agente têm sido amplamente utilizadas, porém ainda existem muitos questionamentos envolvidos, especialmente sobre a capacidade patogênica para diferentes espécies animais (WILKIE *et al.*, 2012).

Exemplificando a interação entre espécies, autores demonstram a habilidade patogênica de cepas B:2 para bovinos, búfalos ou ratos inoculados com pequenas concentrações, a qual não foi demonstrada em aves inoculadas com altas concentrações do mesmo agente (WILKIE *et al.*, 2012). Cepas isoladas de aves podem matar geralmente coelhos e ratos, mas não outros mamíferos. Em outro estudo, algumas cepas de suínos foram descritas como altamente virulentas para aves (FRIEND; FRANSON, 1999). Todas estas questões estão sendo investigadas a partir das ferramentas atualmente existentes.

A transmissão ocorre rapidamente de ave para ave, através do contato com secreções, água de bebida e do ambiente compartilhado. A doença está amplamente presente entre as aves, entre elas, as aves de criação industrial e, principalmente, em criações de perus, os quais são mais susceptíveis que as galinhas. Além disso, podem estar

presentes também em aves silvestres e aves caipiras (QUINN, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Além da cólera aviária que se destaca por gerar elevados prejuízos econômicos à produção avícola brasileira (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000; KONEMAN, 2008), destacam-se também a rinite atrófica progressiva em suínos, a septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos e a pasteurelose em coelhos (ALWIS, 1992; AVANTE, 2008; KONEMAN, 2008, FERREIRA 2011). Estas infecções podem variar de crônicas à septicêmicas e fatais, como nos casos de cólera aviária e septicemia hemorrágica. Além das espécies animais acometidas, alguns casos de pasteurelose em humanos já foram relatados, estando associados principalmente a mordeduras e ou arranhaduras de cães e gatos (FERREIRA 2011, COLLINS *et al.*, 2012, NAGATA *et al.*, 2014).

2.5 Patogenia

O modo de evolução e virulência de *P. multocida* é complexo, variando de casos extremamente graves a casos em que o agente é relativamente avirulento. Isso ocorre porque a patogenicidade irá depender principalmente da cepa e da espécie hospedeira envolvida (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Normalmente, a primeira porção a ser invadida pela bactéria *P. multocida* é o trato respiratório superior, com a adesão e invasão das células epiteliais, porém o microrganismo também pode entrar através de conjuntiva ou lesões cutâneas. A septicemia ocorre pela rápida multiplicação do agente nos tecidos (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008).

A virulência está associada principalmente à presença de fimbrias que facilitam a ligação às mucosas e à presença de cápsula, especialmente nas linhagens tipo A, que esta envolvida na dificuldade da fagocitose do agente pelo sistema de defesa (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008; QUINN, 2005). Acredita-se que quando o agente é replicado em grande quantidade no organismo, ocorre o processo de autólise e liberação de

endotoxinas em quantidade suficiente para causarem lesões aos tecidos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). A endotoxemia severa e a coagulação intravascular disseminada irão causar a doença grave, podendo se tornar fatal (QUINN, 2005).

Sabe-se que *P. multocida* é um habitante natural das vias aéreas de animais imunocompetentes, podendo viver como comensal por muito tempo na região da orofaringe das aves (MUHAIRWA; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000). Entre os fatores envolvidos na patogenicidade de um agente comensal, esta a mudança no *status* sanitário ou variações nas características do próprio microrganismo a partir de trocas genéticas (KUBATZKY, 2012)

Contudo a patogênese de *P. multocida* é pouco conhecida, em virtude das pesquisas envolvendo genética só terem sido realizadas a partir da última década, não sendo anteriormente possível a identificação de genes ou proteínas responsáveis pela virulência (WILKIE *et al.*, 2012).

2.6 Sinais clínicos

Nas infecções agudas as aves podem desenvolver a doença tão rapidamente a ponto de não apresentarem sintomas antes da morte (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Em geral, quando há presença de sintomas clínicos, estes são frequentemente observados algumas horas antes da morte (GLISSO, 2008) com aves apresentando-se apáticas, com penas arrepiadas, recusando-se a andar, inapetentes, febris, além de descarga mucosa pela boca e aumento da frequência respiratória (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Outros sintomas incluem diarreia inicialmente esbranquiçada e, posteriormente, esverdeada, cianose imediatamente antes da morte. Aves que sobrevivem ao estágio agudo podem tornar-se cronicamente infectadas e são importantes fontes de infecção (BACK, 2004; GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

A infecção crônica, resultado da infecção de aves sobreviventes ou por cepas de baixa virulência, não causa sintomas geralmente em perus, sendo de grande impacto por

seu caráter silencioso, levando a prejuízos que só serão observados no abatedouro. Em outras aves, enfraquecimento progressivo e palidez de crista e barbelas são sintomas predominantes. Os sinais estão na dependência da localização da bactéria e órgãos envolvidos, geralmente atingindo articulações, coxim plantar (NASCIMENTO *et al.*, 2009) cavidade peritoneal, oviduto e até ouvido médio, assim ocasionando torcicolo e opistótono (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008).

2.7 Lesões macroscópicas

As lesões irão variar de acordo com a forma de apresentação da doença, a qual depende da patogenicidade do agente e da susceptibilidade do plantel (LIMA; ANDREATTI FILHO, 2006). Em geral, as lesões *post-mortem* incluem hemorragias nas superfícies serosas e acúmulo de fluidos nas cavidades corporais. Na forma crônica, os sinais geralmente ocorrem no local da presença do agente, principalmente na barbela, cavidade esternal e articulações, apresentando aumento de volume nestes locais devido a grande quantidade de exsudato fibrinopurulento (QUINN, 2005).

O fígado pode apresentar edema, congestão e focos de necrose. Nas poedeiras e matrizes pode ocorrer oviposição intrabdominal, ooforite, atresia dos folículos ovarianos, hiperemia dos folículos imaturos e estroma ovárico (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Pesquisadores relataram focos necróticos brancos no fígado e hemorragias no coração, fígado e baço (PANNA *et al.*, 2015), celulite, pericardite, perihepatite, peritonite, aerossaculite e onfalite (PILATTI, 2014).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da doença baseia-se no histórico de animais expostos a fatores estressantes (QUINN, 2005), observação de sintomatologia clínica e lesões encontradas na necropsia. Para a confirmação da suspeita, o isolamento do agente é imprescindível (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Os órgãos de eleição para a coleta e isolamento são: medula óssea (principalmente em casos crônicos), fígado, sangue cardíaco, meninges e lesões localizadas. Em aves vivas pode-se coletar suabe nasal e muco das narinas (GLISSON; HOFACRE; CHRISTENSEN, 2008).

Muitos testes bioquímicos estão disponíveis para a identificação do agente, porém são empregados geralmente apenas para a classificação taxonômica da família *Pasteurellaceae* (CHRISTENSEN *et al.*, 2007). Modelos animais, tais como coelhos, hamsters ou camundongos, também podem ser utilizados para o diagnóstico, a partir do qual é observado o tempo de morte que geralmente varia entre 24 a 48 horas após a inoculação do material suspeito (LIMA; ANDREATTI FILHO, 2006). Além dos camundongos serem altamente susceptíveis a infecção, eles atuam como filtros biológicos, sendo utilizados para aumentar as chances de isolamento do agente (PIJOAN, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 2007). O ponto negativo deste método é a utilização de animais, que esta sendo cada vez mais questionada pelas comissões de ética devido às questões de bem-estar animal (DZIVA *et al.*, 2008).

Com o objetivo de auxiliar nos testes fenotípicos utilizados, testes genotípicos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), auxiliam no diagnóstico da CA de forma rápida e sensível (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Testes de soroglutinação rápida ou ELISA podem ser subjetivos em casos de infecções crônicas e de pouca relevância em casos de infecções agudas (LIMA; ANDREATTI FILHO, 2006), devido ao curso rápido da infecção não havendo tempo suficiente para a formação de uma resposta imune mensurável (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

2.9 Fatores associados à virulência

Os fatores de virulência estão relacionados às estruturas, produtos ou estratégias de algumas cepas bacterianas que contribuem para aumentar sua capacidade patogênica (SIRCILI; TRABULSI, 2005). Os microrganismos patogênicos se diferenciam daqueles apatogênicos por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, os quais contribuem para a colonização e a ocorrência de diversos eventos no hospedeiro (VIEIRA, 2009). Protocolos de multiplex-PCR foram desenvolvidos por Furian (2013) para investigar a presença de quinze genes associados à virulência em cepas de *P. multocida* isoladas de casos clínicos de CA. O autor identificou todos os genes propostos e concluiu que os protocolos de multiplex PCR são importantes na rápida detecção de genes de virulência (FURIAN, 2013). Além disso, fatores ambientais e relacionados ao hospedeiro podem ser tão importantes quanto os genes associados à virulência, na indução de doença, especialmente por bactérias comensais como a *P. multocida* (ATASHPAZ *et al.*, 2010). Muitos fatores de virulência têm sido associados a variação de patogenicidade entre as cepas. Entre os principais podemos citar a cápsula e os lipopolissacarídeos (LPS) (NASCIMENTO *et al.*, 2009; BOERLIN, 2010, BOYCE *et al.*, 2010).

2.9.1 Cápsula

A cápsula é considerada um fator de virulência para *P. multocida*, porque cepas patogênicas que não possuem cápsula são menos virulentas do que as cepas encapsuladas. Existe variação de virulência também entre os grupos capsulares, sendo percebida pela presença de diferentes tipos capsulares em surtos da doença, bem como pelo isolamento de microrganismos pertencentes a um grupo capsular que é considerado de pouca importância para determinada espécie (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Geralmente os sorogrupos capsulares B e E estão envolvidos em casos de septicemia hemorrágica, o sorogrupo A é o mais encontrado em variantes da CA, e o sorogrupo D geralmente está associado a casos de rinite atrófica (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000).

As maiores cápsulas têm sido identificadas no sorogrupo A. A composição destas cápsulas são em grande extensão de ácido hialurônico (CARTER, 1967). Já os sorogrupos D são compostos por heparina, e isolados do tipo F apresentam cápsulas que são compostas por polímero de condroitina (DE ANGELIS *et al.*, 2002). Todos esses polissacarídeos que fazem parte das composições capsulares são denominados glicosaminoglicanos (GAG's). Esses componentes estruturais desempenham um importante papel na adesão celular e na regulação da atividade de várias proteínas. Algumas dessas moléculas possuem um mecanismo de escape bacteriano pela sua composição semelhante às células eucarióticas (BOYCE *et al.*, 2010).

A função da cápsula na patogenicidade esta relacionada com a capacidade em resistir à dessecação no meio ambiente, a maior aderência a tipos celulares específicos, a maior resistência à fagocitose e a interação com o sistema complemento do hospedeiro (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). A capacidade antifagocitária é relacionada com a hidrofobicidade que a cápsula confere à superfície da bactéria (BOROWSKI, 2001).

2.9.2 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS é um componente da parede da célula bacteriana típica de agentes patogênicos gram-negativos (HEDDLESTON *et al.*, 1972) e considerado um importante fator de virulência, assim como a cápsula (HARPER *et al.*, 2011a). Os 16 sorotipos conhecidos foram classificados a partir da composição dos antígenos somáticos presentes no LPS (HEDDLESTON *et al.*, 1972). De todos os sorotipos descritos, alguns se mostraram geneticamente relacionados, o que significa que eles podem compartilhar o mesmo *locus* do exterior do núcleo (HARPER *et al.*, 2011b).

A virulência do LPS já foi comprovada através de estudos que alteraram a expressão gênica dos oligossacarídeos do LPS e com isso foi possível diminuir a virulência das cepas de *P. multocida*. A toxicidade do LPS ou endotoxina será variável e irá depender da interação com o tipo de hospedeiro infectado (BOYCE *et al.*, 2010). A grande quantidade dessas endotoxinas disponíveis em lises bacterianas pode levar à morte por choque hemorrágico e pela necrose dos tecidos (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.9.3 Fímbrias, adesinas e proteínas de membrana externa (OMPs)

As fímbrias são estruturas bacterianas filamentosas de natureza protéica que apresentam uma alta capacidade adesiva pela superfície de hemácias e outros tipos celulares de animais, plantas e fungos (DUGUID; ANDERSON; CAMPBELL, 1966; BOROWSKI, 2001).

O isolamento de cepas de *P. multocida* tipo A e D apresentando fímbrias têm sido descrito em diferentes espécies animais por inúmeros autores, destacando-se aves, suínos e coelhos (GLORIOSO *et al.*, 1982; TRIGO; PIJOAN, 1988; PIFFER; CASTRO, 1993).

Muitos genes que codificam fímbrias e adesinas, incluindo *ptfA*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf1* e *hsf2*, são semelhantes às encontradas em outras bactérias (HARPER, BOYCE; ADLER, 2006; CORNEY *et al.*, 2007). A fímbrias do tipo IV, expressa pelo gene *ptfA*, é bastante estudada por ser identificada em isolados de *P. multocida* responsáveis por causar a CA (DOUGHTY; RUFFOLO; ADLER, 2000). A conexão de adesinas fimbriais no contato inicial desempenha um papel crítico na colonização extracelular ou internalização do microrganismo. As adesinas se ligam a receptores de superfície da célula do hospedeiro e essa capacidade de adesão dependerá principalmente do tipo de órgão e do hospedeiro envolvido (GYLES; PRESCOTT, 2010).

As proteínas de membrana externa funcionam como barreiras seletivas que impedem a entrada de muitas moléculas tóxicas na célula, capacidade extremamente importante para a sobrevivência da bactéria. Além disso, essas proteínas exercem vários outros papéis, tais como, absorção de nutrientes, transporte de moléculas para dentro e para fora da célula, além de interagirem com o tecido do hospedeiro e com o ambiente (HATFALUDI *et al.*, 2010).

2.9.4 Toxina dermonecrótica

A toxina dermonecrótica ou *Pasteurella multocida toxin* (PMT) é um importante fator de virulência e representa o único tipo de exotoxina descrita em cepas da espécie

(LAX; CHANTER, 1990). A PMT é expressa principalmente por cepas do sorogrupo D, e em um menor número, pelo sorogrupo A (NAGAI; SOMENO; YAGIHASHI, 1994).

Em suínos, as linhagens toxigênicas estão relacionadas principalmente a rinite atrófica progressiva, porém sua importância em casos de pneumonia ainda não é bem definida (BOROWSKI *et al.*, 2007). As infecções por *Bordetella bronchiseptica* podem causar atrofia progressiva moderada das conchas nasais sem distorção significativa do focinho. Este agente, juntamente com linhagens não-toxigênicas de *P. multocida*, estão amplamente distribuídos em criações de suínos, mas a introdução de um portador de *P. multocida* toxigênica pode iniciar um surto de rinite atrófica progressiva rapidamente em um rebanho susceptível (QUINN, 2005).

Testes em camundongos e análise por PCR são utilizados na identificação de cepas toxigênicas de *P. multocida* (PULLINGER; BEVIR; LAX, 2004; NAGAI; SOMENO; YAGIHASHI, 1994; ATASHPAZ; SHAYEGH; HEJAZI, 2009). Quando estas amostras são testadas em camundongos, causa lesões necróticas na pele decorrentes da inoculação intradérmica, e quando aplicada por via intraperitoneal, pode ser letal (PULLINGER; BEVIR; LAX, 2004). A PCR tem revelado boa sensibilidade e especificidade representando uma alternativa a estes testes (NAGAI; SOMENO; YAGIHASHI, 1994; ATASHPAZ; SHAYEGH; HEJAZI, 2009). As cepas toxigênicas produzem uma toxina codificada pelo gene cromossômico *toxA* (LICHTENSTEIGER *et al.*, 1996) e este gene tem sido detectado através da utilização da PCR (BOROWSKI, 2001).

Em cepas de origem aviária, este gene parece não ser tão frequente. Ozbey e Muz (2006) inocularam camundongos experimentalmente com isolados provenientes de lesões pulmonares de aves e identificaram o agente através da PCR e isolamento bacteriano, entretanto todas as cepas foram negativas para a presença do gene *toxA*.

2.10 Estudos de patogenicidade

Os órgãos coletados para o isolamento de *P. multocida* podem ser inoculados em coelhos, hamsters ou camundongos pelas vias subcutânea ou intraperitoneal com um volume de 0,2 mL de solução bacteriana *overnight*. Quando as cepas são positivas, geralmente a mortalidade ocorre em um período de 24 a 48 horas, e o reisolamento pode ser realizado a partir do fígado, do sangue ou do coração dos animais (NASCIMENTO *et al.*, 2009). A passagem em camundongos representa um método bastante eficiente na detecção de *P. multocida*, embora neste caso sejam selecionadas apenas estirpes patogênicas para esta espécie (BALDRIAS *et al.*, 1988).

A patogenicidade associada à mortalidade foi descrita por Okerman, Spaghe & De Bruycker (1979), os quais investigaram o potencial patogênico de 20 cepas de *P. multocida* isoladas de coelhos domésticos para camundongos. Os autores observaram diferença na virulência dos isolados devido à variação da severidade da doença. Houve relação entre as cepas de alta virulência para os camundongos, com os isolados de casos clínicos graves e agudos de coelhos, e também entre as amostras de severidade moderada, que estavam associadas a casos de retardo no crescimento e mortalidade elevada distribuída, a longo prazo, por todo o período de engorda.

Rajini *et al.* (1995) realizaram um estudo para avaliação da patogenicidade de 30 cepas coletadas de aves suspeitas de CA. O material foi diluído e inoculado por via intraperitoneal em camundongos. Esse estudo foi baseado na análise da média do tempo de morte dos animais inoculados. As cepas com uma média do tempo de morte de 10 horas foram consideradas as mais virulentas. A maioria dos isolados mostrou uma média de tempo de morte entre 10 a 18 horas e apenas uma cepa apresentou baixa virulência com uma média de tempo de morte de 25 a 30 horas.

No estudo de Balakrishnan e Roy (2012), isolados de *P. multocida* de galinhas e perus foram confirmados através de isolamento, identificação do agente, estudos relacionados à patogenicidade e antibiograma. Para avaliar a patogenicidade de *P. multocida*, a bactéria foi inoculada por via intraperitoneal e a morte foi observada por um

período de 48 horas. Todos os animais inoculados morreram em 24 a 48 horas e 100% das cepas foram reisoladas.

Sotoodehnia *et al.* (2004), utilizaram cepas do sorotipo A1 isoladas de casos de CA para determinar a virulência através da inoculação de aves e camundongos. Os resultados deste trabalho indicaram que as cepas A1 foram virulentas para ambas as espécies. Na necropsia, a congestão vascular e pequenas áreas de hemorragia distribuídas entre os órgãos viscerais foram compatíveis com aquelas encontradas em caso de CA.

Ahmed *et al.* (2014) realizaram um estudo através da inoculação em camundongos de cepas de *P. multocida* isoladas de casos de septicemia hemorrágica e avaliaram critérios como sinais clínicos, mortalidade, isolamento bacteriano e lesões patológicas. Em geral, os camundongos apresentaram febre, depressão, anorexia, após 24 horas de inoculação e morreram entre 24 a 72 horas. Os camundongos apresentaram diferentes lesões, entre elas esplenomegalia, hepatomegalia e hemorragia petequial similar ao que se observa em bovinos e búfalos doentes. Neste trabalho, o camundongo foi considerado um modelo ideal para o diagnóstico de septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos. Outro estudo semelhante foi descrito por Hussaini *et al.* (2013).

Muitos estudos de patogenicidade envolvem apenas a capacidade letal do agente estudado. Com o objetivo de gerar novos elementos para o maior entendimento da patogenicidade das bactérias, Souza (2010) traçou uma nova metodologia de classificação para cepas de *Escherichia coli* em pintos de corte de um dia, onde o autor considerou além do número de animais mortos, o tempo de morte e a capacidade da cepa em causar lesões compatíveis com a doença. A partir da formulação de uma equação matemática, utilizando os valores numéricos representativos das variáveis analisadas, foi possível classificar o grau de patogenicidade das cepas em: alta, intermediária ou baixa e cepas apatogênicas.

Pilatti (2014) utilizou a mesma metodologia de Souza (2010) para a classificação da patogenicidade de cepas de *P. multocida* através da inoculação em pintinhos de um dia. O índice de patogenicidade estabelecido pela autora permitiu a mensuração e classificação da patogenicidade dos isolados e pode ser uma alternativa aos modelos subjetivos de triagem de patogenicidade utilizados até o momento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética no uso de animais

Para a realização desta pesquisa, procedeu-se o envio e aprovação do projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), sob o Protocolo de número 01/2015, conforme Apêndice A.

3.2 Local de estudo

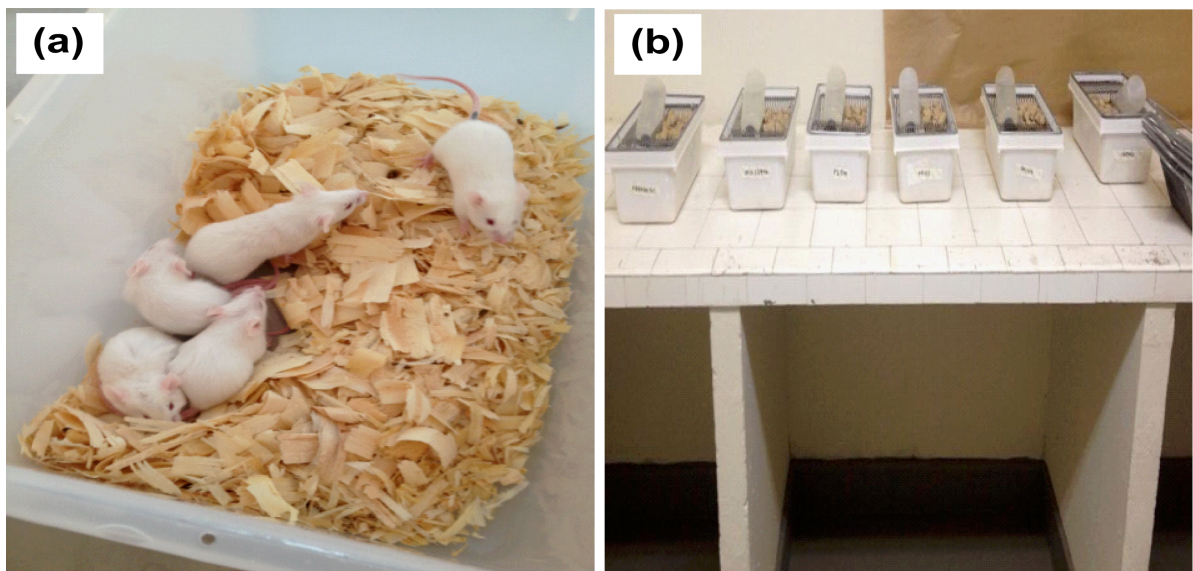
Todos os procedimentos, tais como o preparo das cepas a serem inoculadas, infecção experimental em camundongos, avaliação das lesões macroscópicas observadas durante a necropsia, bem como o reisolamento bacteriano das amostras, foram realizados no Laboratório de Saúde das Aves e no setor de biotério experimental do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), localizado no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul.

3.3 Aquisição e manutenção dos camundongos

Os camundongos utilizados foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais eram heterogêneos, fêmeas, da linhagem Swiss e apresentavam-se com 8 semanas de idade. Os camundongos foram alojados em salas de isolamento com ambiência adequada, umidade e temperatura monitoradas e controladas de acordo com a zona de conforto térmico preconizada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Os animais foram alocados dentro de caixas plásticas experimentais de contenção, que seguiam o cálculo de espaço físico recomendado para o bem-estar individual: $>25 \text{ g} \text{ --- } 96,75\text{cm}^2$ (GARBER *et al.*, 2011). Em cada caixa de contenção, foram distribuídos 5 animais, que diariamente recebiam água e ração comercial completa para animais de laboratório na forma de *pellet* (NUVILAB CR-1[®]) *ad libitum*. Para a forração das caixas, utilizou-se maravalha comercial (VETSUL[®]) em escamas (Figura 1).

Figura 1 - Alojamento dos camundongos em caixas experimentais e distribuição das caixas na sala de isolamento.



(a) Distribuição dos camundongos na caixa experimental; (b) distribuição das caixas experimentais na sala de isolamento.

3.4 Amostras

Para a realização deste estudo, foram selecionadas 94 cepas de *P. multocida* que foram inoculadas em nove módulos ou baterias experimentais. Dentre estas, 56 cepas foram obtidas de casos clínicos de CA e 38 foram isoladas de suínos e de javalis em matadouro-frigorífico.

Todas as cepas encontravam-se estocadas em sangue puro de ovino à temperatura de -80°C no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA). Para a reativação destas amostras, utilizou-se o caldo de cultura não seletivo BHI (*Brain Heart Infusion – Oxoid[®]*). Uma alíquota de $20\mu\text{L}$ da solução estoque de *P. multocida* foi transferida para 5 mL de caldo BHI e os tubos mantidos em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram estriadas em dois meios distintos: ágar sangue adicionado de 5% de sangue ovino e ágar MacConkey. O primeiro representa uma excelente fonte de nutrientes para as bactérias do gênero *Pasteurella sp.*, enquanto o segundo inibe o crescimento do agente (MARKEY *et al.*, 2013). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica nas mesmas condições citadas anteriormente. Após este período procedeu-se a identificação das características morfológicas das colônias e a realização de provas bioquímicas de catalase e de oxidase.

3.5 Dose letal 50%

Para a definição do volume de inóculo e do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) a ser utilizado em cada infecção experimental, utilizou-se a concentração de 10^6 UFC, que corresponde ao valor de DL_{50} determinado por Pilatti (2014) e Hazarika *et al.* (2011). Tanto no trabalho de Pilatti (2014), quanto no de Hazarika *et al.* (2011), a concentração de 10^6 UFC foi eficiente no estabelecimento da mortalidade de 50% de pintinhos e camundongos, respectivamente.

3.6 Preparo do inóculo

A padronização do inóculo foi realizada anteriormente por Pilatti (2014) a partir da técnica de contagem de UFCs (técnica da gota) estabelecida da seguinte forma: uma

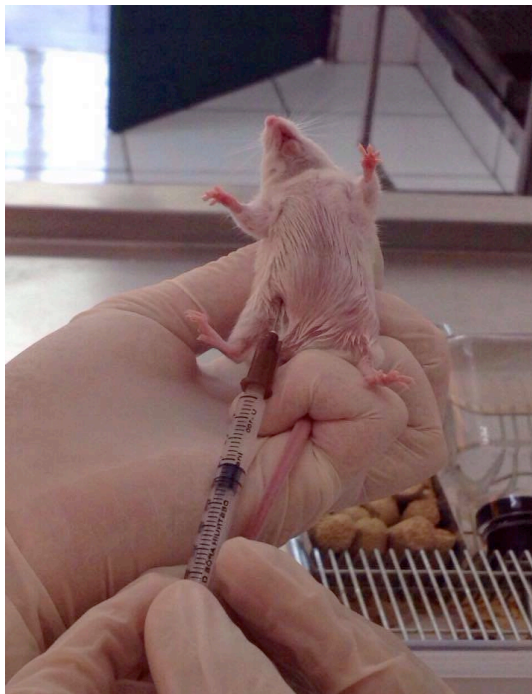
colônia de *P. multocida* sob cultivo *overnight* em AS foi suspensa em 5 mL de caldo BHI, em seguida as soluções sofreram diluições em solução salina 0,85% estéril, obtendo-se diferentes concentrações. Uma alíquota de 20 μ L de cada diluição foi pipetada em quintuplicata em placas de AS. A contagem de UFCs foi estabelecida a partir da multiplicação do número de colônias obtidos nas 5 gotas por 50 (fator de correção de 20 μ L para 1 mL) e dividido pelo número de gotas (5). Após este cálculo foi estabelecida a relação da diluição que estava sendo contada e assim foi obtida a média em UFC/mL de cada amostra. O número de células observadas na suspensão inicial foi de 10^7 UFC/mL, a partir da qual realizamos a diluição das amostras para a inoculação.

Para o preparo dos inóculos, uma alíquota de uma colônia de cada amostra obtida de um cultivo *overnight* em ágar sangue suplementado com 5% de sangue ovino foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de BHI estéril. Após homogeneização, 1 mL desta solução foi transferida para outro tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,85% estéril. Assim, o número de UFC/mL inicial passou de 10^7 para 10^6 . Posteriormente, 0,1 mL desta solução foi utilizada para a inoculação dos camundongos.

3.7 Inoculação

Foram realizadas 9 baterias experimentais, em cada uma delas foram inoculados de 10 a 14 cepas e todas estas baterias foram acompanhadas de um grupo controle. Cada cepa foi inoculada em um grupo formado por 5 camundongos, totalizando 470 camundongos testados, somados a mais 45 camundongos utilizados como controle negativo. As cepas foram inoculadas com 0,1 mL da solução preparada através da via intraperitoneal, conforme demonstrado na Figura 2. Da mesma maneira, o grupo controle continha 5 camundongos que foram inoculados com 0,1 mL de solução salina 0,85% estéril pela mesma via de inoculação dos grupos desafiados. Após a inoculação dos camundongos, eram realizadas visitas a cada 6 horas nas salas de isolamento e os animais mortos eram recolhidos.

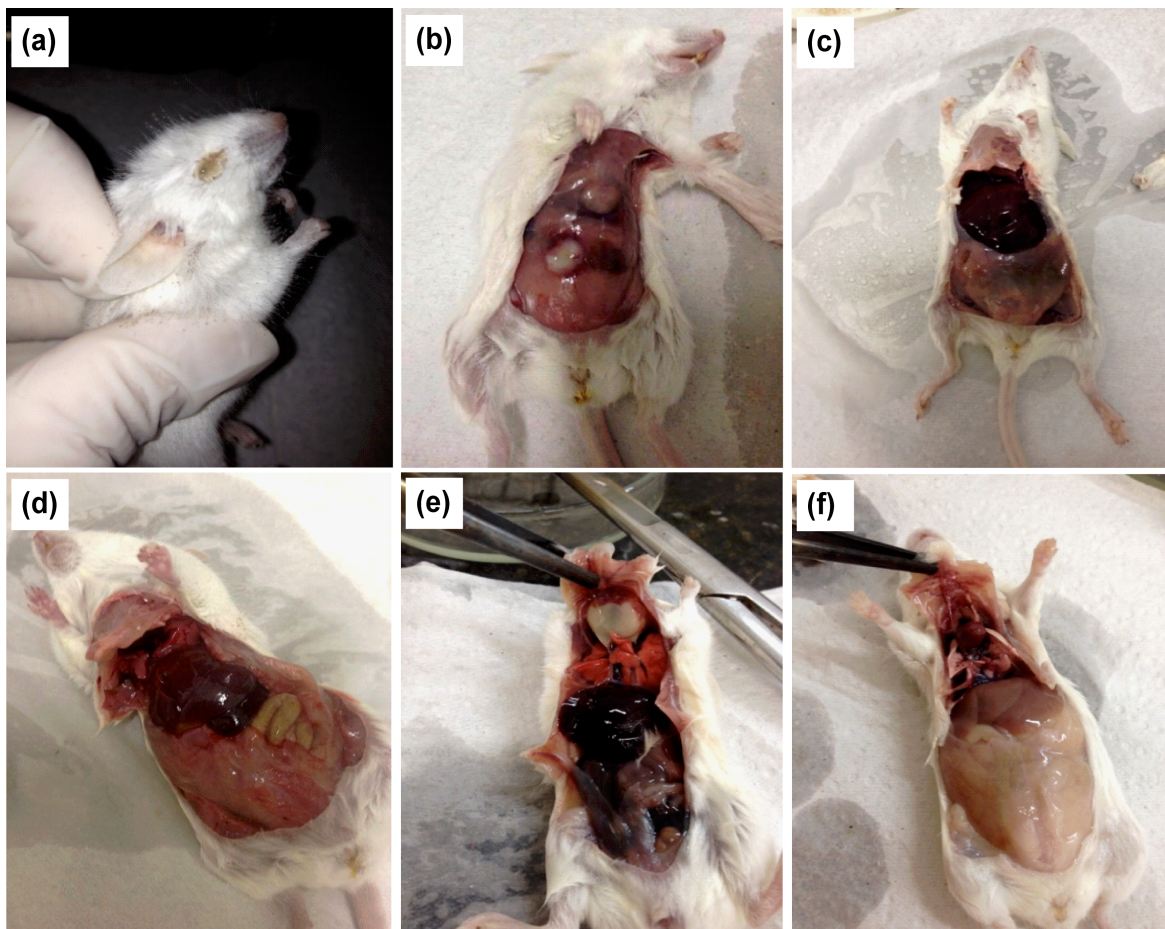
Figura 2 - Inoculação por via intraperitoneal dos camundongos.



3.8 Mortalidade, lesões macroscópicas e reisolamento bacteriano

O dia e horário da morte eram registrados e os animais mortos de cada grupo eram necropsiados e avaliados quanto à presença de cinco lesões macroscópicas. Para a avaliação das lesões foram seguidos especialmente os modelos já observados por Hazarika *et al.* (2011) e Pilatti (2014). As lesões avaliadas foram: conjuntivite, lesão inflamatória no local de aplicação, pericardite e fígado e pulmões congestionados e hemorrágicos. As lesões analisadas na necropsia dos camundongos do atual experimento encontram-se exemplificadas na Figura 3.

Figura 3 - Lesões macroscópicas observadas nos camundongos necropsiados após inoculação com as cepas de *Pasteurella multocida* selecionadas.

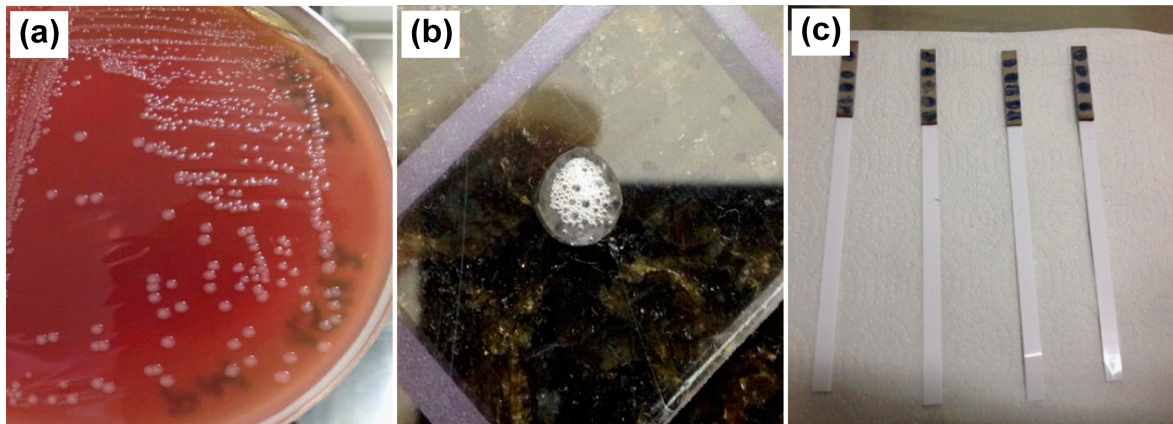


(a) Conjuntivite; (b) Lesão inflamatória no local de aplicação; (c) Fígado congesto; (d) Pulmão hemorrágico; (e) Pericardite; (f) animal sem lesão. Todas as imagens foram geradas durante a necropsia dos animais utilizados neste estudo.

Para o reisolamento bacteriano, o coração, baço e em alguns casos de pericardite, o fígado, foram coletados assepticamente e inoculados em 5 mL de caldo BHI. O diagnóstico bacteriológico seguiu os mesmos passos descritos para a reativação das cepas de *P. multocida* estocadas em sangue total. Após 24 horas de incubação a 37°C, as soluções foram homogeneizadas e semeadas em Ágar Sangue (AS) suplementado com 5% de sangue ovino e em Ágar MacConkey, e novamente incubadas a 37°C por 24 horas (AMIGOT *et al.*, 1998 *apud* CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). As colônias obtidas no AS foram observadas quanto às características morfológicas e foram realizadas provas bioquímicas de

catalase e de oxidase (Figura 4).

Figura 4 - Isolamento de *Pasteurella multocida* em Ágar Sangue e testes de catalase e oxidase.



(a) Crescimento de colônias em placa de ágar sangue (AS) suplementado com 5% de sangue ovino; (b) Teste de catalase positivo; (c) Teste de oxidase positivo.

3.9 Cálculo do índice de patogenicidade

O cálculo do Índice de Patogenicidade (IP) foi baseado no trabalho descrito por Souza (2010) e Pilatti (2014). Para a sua determinação, o critério Tempo de Morte (TM) foi utilizado conjuntamente com a avaliação das lesões macroscópicas. Os dois critérios receberam pontuações iguais, equivalendo a escores de 5 pontos cada.

Para avaliar o tempo de morte, foram realizadas visitas a cada 6 horas. Camundongos que morreram nas primeiras 12 horas pós-inoculação receberam escore máximo (1) para o TM avaliado. A partir das 18 horas, foi feita a diminuição proporcional do valor atribuído, calculando-se um Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) da seguinte maneira: o fator máximo de TM 1 foi dividido pelas 28 vezes (a cada 6 horas) em que os camundongos foram monitorados no período de 7 dias, obtendo-se o valor de 0,0357. Para cada dia em que os camundongos sobreviveram, diminuiu-se 0,0357 do fator

máximo estabelecido (1). Os valores obtidos para o TM foram multiplicados pelo valor 5, correspondente ao escore de pontos. Os camundongos sobreviventes, que foram eutanasiados no sétimo dia pós-inoculação, receberam o valor zero (0) para o critério tempo de morte.

Os cinco pontos atribuídos às lesões foram divididos pelo número de lesões avaliadas. A divisão do escore máximo de lesões (5) pelo número de lesões avaliadas (5) resultou no valor atribuído um (1) para cada lesão. Os camundongos que morreram nas primeiras 12 horas receberam os escores máximos para os dois critérios avaliados, resultando em Índice de Patogenicidade Individual (IPI) máximo (10).

Tabela 1 - Relação entre o tempo de morte e o valor atribuído ao Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) e relação entre o número de lesões e o respectivo valor atribuído.

Fator de Bonificação de Sobrevivência			Somatório do Escore de Lesões	
Hrs	TM	FBS	Nº de lesões	Valor
12	1	5	5	5
18	0,9643	4,8215	4	4
24	0,9286	4,643	3	3
30	0,8929	4,4645	2	2
36	0,8572	4,286	1	1
42	0,8215	4,1075	0	0
48	0,7858	3,929		
54	0,7501	3,7505		
60	0,7144	3,572		
66	0,6787	3,3935		
72	0,643	3,215		
78	0,6073	3,0365		
84	0,5716	2,858		
90	0,5359	2,6795		
96	0,5002	2,501		
102	0,4645	2,3225		
108	0,4288	2,144		
114	0,3931	1,9655		
120	0,3574	1,787		
126	0,3217	1,6085		
132	0,286	1,43		
138	0,2503	1,2515		
144	0,2146	1,073		

150	0,1789	0,8945
156	0,1432	0,716
162	0,1075	0,5375
168	0,0718	0,359
EUT	0,00	0

EUT = Camundongos que sobreviveram e foram eutanasiados no sétimo dia.

Assim, o Índice de Patogenicidade Individual calculado foi gerado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IPI} = \text{TM} \times 5 + (\text{CONJ} + \text{CL} + \text{PH} + \text{FC} + \text{PC})$$

Onde:

IPI = Índice de Patogenicidade individual

TM = Tempo de Morte

CONJ = Conjuntivite

LI = Lesão inflamatória no local de aplicação

PH = Pulmão hemorrágico ou congesto

FC = Fígado hemorrágico ou congesto

PC = Pericardite

Para calcular o Índice de Patogenicidade (IP) de cada cepa inoculada no grupo formado por 5 camundongos, os valores obtidos através do cálculo do IPI foram somados e a média aritmética foi gerada, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{IP} = \frac{\sum(\text{IPI})}{N}$$

N

Onde:

IP = Índice de Patogenicidade da cepa

\sum IPI = Somatório dos Índices de Patogenicidade Individuais

N = Número de camundongos inoculados

Tabela 2 - Representação da execução do cálculo do Índice de Patogenicidade (IP) por cepa de *Pasteurella multocida* inoculada em camundongos.

Amostra	Animal	Hrs	TM	FBS	CONJ	LI	PH	FH	PC	Lesões	IPI
	1	30	0,8929	4,46	0	0	1	1	0	2	6,46
	2	36	0,8572	4,29	0	0	1	1	0	2	6,29
824	3	54	0,7501	3,75	0	0	1	1	0	2	5,75
	4	72	0,643	3,22	0	1	1	1	1	4	7,22
	5	78	0,6073	3,04	0	1	1	1	1	4	7,04
IP AMOSTRA: 6,55											

1 = Ocorrência de lesão

0 = Ausência de lesão

IPI = Soma do FBS e dos valores das lesões

IP Amostra = Média aritmética dos valores do IPI

3.10 Análise estatística

Em função das amostras não seguirem uma distribuição normal, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos: análise da variância (ANOVA), teste de Mann Whitney, Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn's para verificar a significância da variação estatística encontrada entre as origens das cepas, tempo de morte, percentual de lesões e índices de patogenicidade. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico *Graphpad Prism* versão 6.0, obtendo-se como referencial o nível de significância de 5%.

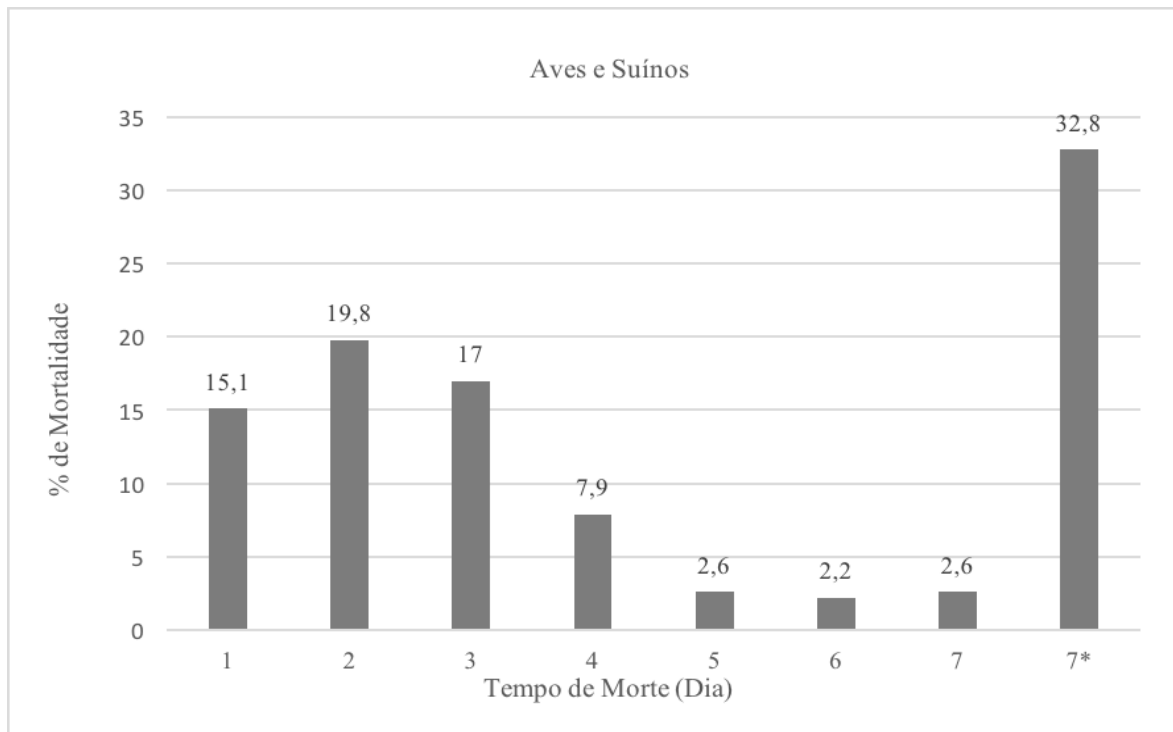
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo classificar a patogenicidade de cepas de *P. multocida*, a partir da metodologia utilizada anteriormente por Souza (2010) e Pilatti (2014), com um ajuste no tempo de observação dos animais. Através deste estudo foi possível estabelecer um índice de patogenicidade para cada cepa analisada. Os principais critérios utilizados para o estabelecimento deste índice foram a letalidade observada a cada 6 horas durante um período de 7 dias (principal variável a ser considerada), bem como as lesões macroscópicas que os animais apresentavam. Além do percentual de mortalidade, a observação das lesões macroscópicas também é importante, uma vez que uma variedade de lesões pode ser encontrada em animais que não vieram a óbito. Estas lesões se desenvolvem a longo prazo e muitas vezes o tempo de observação pode não ser suficiente para caracterizar de forma adequada a patogenicidade dessas cepas.

4.1 Mortalidade e tempo de morte avaliado

A septicemia, seguida de morte, esteve presente nas amostras consideradas patogênicas. A maior mortalidade foi registrada nos três primeiros dias pós inoculação (pi) totalizando nesse período 51,9% de camundongos mortos, conforme demonstra o Gráfico 1. Nos dias 4, 5, 6 e 7, a taxa de mortalidade foi reduzida. Ao final do período de avaliação (07 dias), 67,2% dos camundongos inoculados morreram e 32,8% foram eutanasiados.

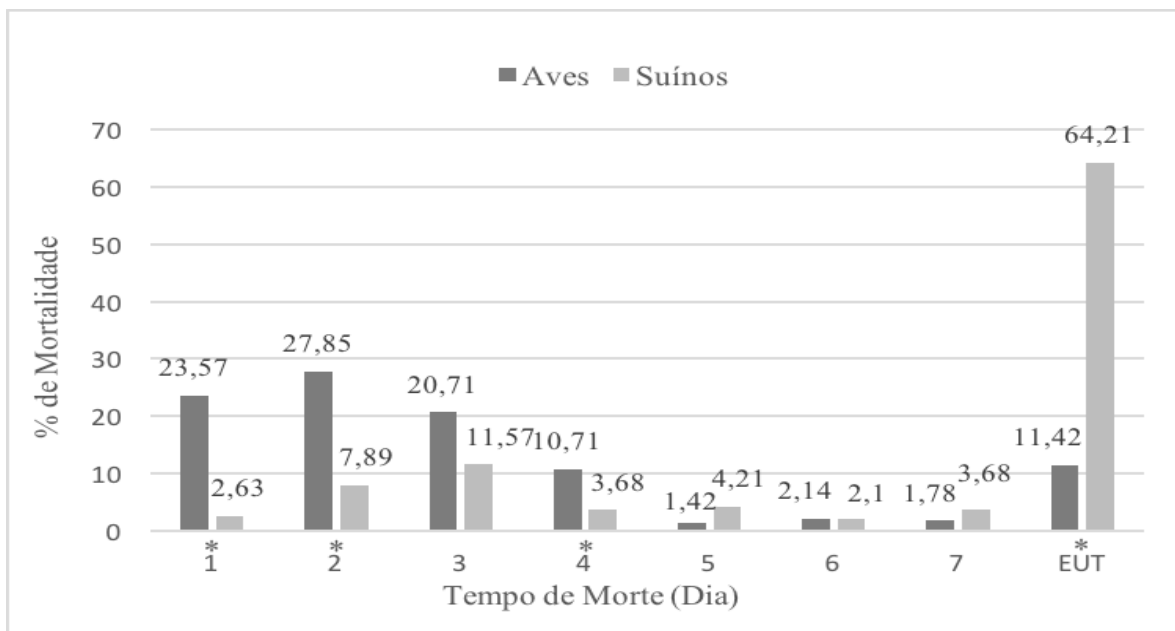
Gráfico 1 - Relação percentual entre a mortalidade e o período de morte avaliado (7 dias) para o total de camundongos inoculados independentemente da origem das cepas.



7* camundongos que sobreviveram e foram eutanasiados no sétimo dia pós inoculação.

No Gráfico 2 é descrito o percentual de mortalidade diária dos animais desafiados, conforme a origem das cepas. É possível observar que houve diferença estatística no percentual de mortalidade de acordo com a fonte de isolamento, o qual mostrou-se maior entre cepas aviárias, especialmente no 1º, 2º e 4º dia (Gráfico 2). Diferenças também foram reveladas no percentual de camundongos sobreviventes ao final dos sete dias de avaliação, sendo estatisticamente maior em animais inoculados com cepas suínas.

Gráfico 2 - Relação percentual entre a mortalidade e o período de morte avaliado (7 dias) para o total de camundongos inoculados conforme a origem das cepas.



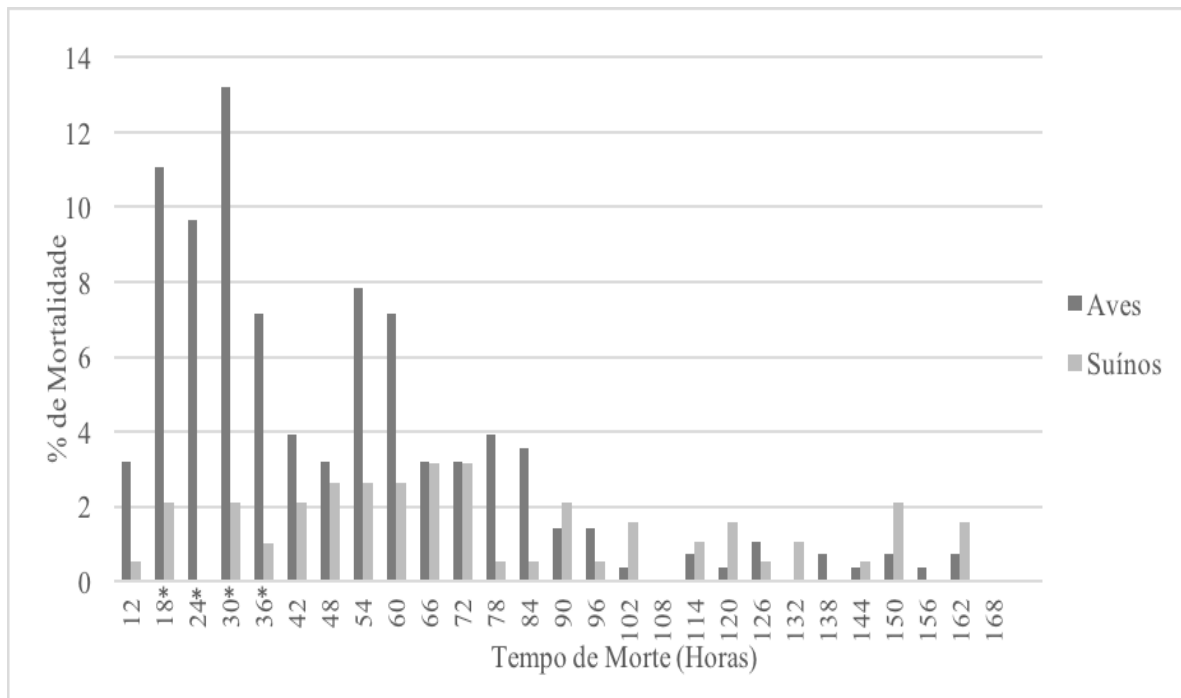
Teste de múltiplas comparações de Dunn's.

EUT = camundongos que sobreviveram e foram eutanasiados no sétimo dia pós-inoculação.

* = diferença estatística significativa ($P < 0,0001$).

Com o objetivo de proporcionar uma avaliação mais precisa a respeito do potencial patogênico das cepas de *P. multocida* para os camundongos inoculados, o período de 6 horas foi estabelecido entre as observações diárias. De acordo com este método de avaliação, foi possível verificar com maior precisão as variações estatísticas da mortalidade periódica para as diferentes origens das cepas, assim como demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Relação percentual entre a mortalidade e o período de morte avaliado (168 horas) para o total de camundongos inoculados.



Teste de comparação entre grupos de Mann-Whitney

* = diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

A inoculação de cepas de origem aviária geralmente leva os camundongos a óbito dentro de 24 a 48 horas (RIMLER R.B.; GLISSON J.R., 1997). Ozbey e Muz (2006), ao inocularem camundongos com cepas obtidas a partir de lesões pneumônicas de frangos, evidenciaram a ocorrência da mortalidade em um período de 48 horas para a maioria dos inoculados. A maior mortalidade entre as cepas de aves até 48 horas (51,42%) neste experimento está de acordo com os dados da literatura. Levando em consideração as observações realizadas a cada 6 horas, dentro deste mesmo período (48 horas), foi possível identificar que os picos de mortalidade e diferenças estatísticas em comparação com as cepas de origem suína, foram observadas às 18, 24, 30 e 36 horas.

Apesar da mortalidade ter seguido um índice baixo e constante para as cepas de origem suína, foi possível observar um pico de mortalidade que ocorreu entre 48 a 72 horas

(14,19%) pós inoculação. Este período de mortalidade também foi observado por Hazarika *et al.* (2011) para a maioria dos animais inoculados com amostras suínas.

Os resultados deste trabalho foram semelhantes aos de Pilatti (2014), no que se refere à patogenicidade estatisticamente maior das cepas de origem aviária em comparação aos isolados de suínos.

4.2 Sinais clínicos, alterações patológicas e reisolamento bacteriano

4.2.1 Sinais clínicos

Os primeiros sinais clínicos foram observados a partir das 12 horas pós inoculação. Os camundongos mostravam-se amontoados e febris, com pelos arrepiados, depressivos, anoréxicos, apáticos e apresentavam dificuldade respiratória e cianose nas extremidades próximo ao período de morte. Alguns animais apresentavam também secreção ocular purulenta e raramente torcicolo e desconfortos locomotores que estavam associados à linfadenopatia evidenciada na necropsia.

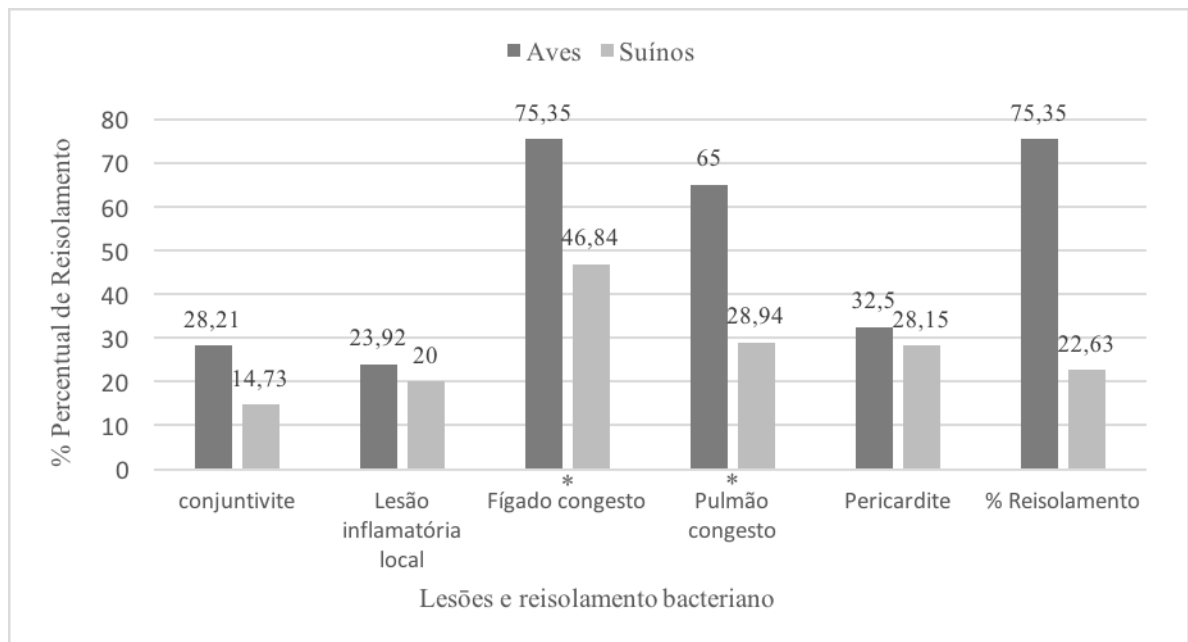
O estudo sobre a avaliação de patogenicidade de *P. multocida* tipo B em camundongos conduzido por Ahmed *et al.* (2014) revelou sinais muito semelhantes aos encontrados. Os animais apresentavam febre, depressão, anorexia, apatia, ataxia, cianose de extremidades e crostas ao redor dos olhos e nariz (AHMED *et al.*, 2014).

4.2.2 Alterações patológicas e reisolamento bacteriano

Os camundongos mostraram lesões macroscópicas evidentes, as quais diferiam em termos de gravidade de um animal para outro e de um grupo para outro, assim como ocorreu com a avaliação do tempo de morte (TM). De acordo com o percentual das lesões obtidas, foi possível observar que em todas as situações as cepas de origem aviária ocasionaram um maior número de lesões nos camundongos e esta diferença conforme a

origem dos isolados foi estatisticamente significativa quanto à frequência de fígado e pulmões hemorrágicos ou congestos. O mesmo foi observado em relação ao percentual de reisolamento (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Frequência de lesões macroscópicas e percentual de reisolamento conforme a origem das cepas de *Pasteurella multocida*.



Teste de comparação entre grupos de Mann-Whitney

* = diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

As lesões apresentadas no Gráfico 4 são alterações patológicas comuns às encontradas em infecções por *P. multocida*. Enquanto alguns animais não demonstraram alterações comportamentais ou lesões macroscópicas, em geral, naqueles que apresentavam, havia uma secreção purulenta nos olhos, o fígado mostrou-se aumentado, congesto e com petéquias, além de raros focos brancos ou amarelados. Akhtar (2013), ao inocular camundongos com cepas de *P. multocida* de origem aviária, observou lesões septicêmicas com focos brancos de necrose e hemorragia no fígado e coração.

Os pulmões, órgão pelo qual *P. multocida* apresenta maior tropismo (NASCIMENTO *et al.*, 2009), mostraram moderada a grave congestão e petéquias. O coração, em muitos casos no estudo, apresentava-se envolto por uma espessa camada fibrinosa formada a partir do pericárdio. Em casos de pericardite em suínos analisados por Coelho *et al.* (2014), *P. multocida* foi o agente bacteriano mais isolado da lesão. O autor comprovou a associação significativa entre o isolamento de *P. multocida* e *Streptococcus spp.* no coração e no pulmão correspondente, sugerindo que a infecção no pulmão possa servir de porta de entrada para a colonização do pericárdio adjacente. No Gráfico 4, nota-se que coincidentemente houve relação entre o percentual encontrado para ambas as lesões de camundongos inoculados com cepas suínas.

Algumas das lesões observadas nos camundongos infectados no estudo também podem ser comumente encontradas em casos de CA. Em geral, as principais alterações patológicas encontradas em aves são: petéquias nas vísceras, fígado edemaciado com focos necróticos, pericardite, aerossaculite, celulite, endocardite, peritonite, ooforite, além de sinusite, osteomielite, sinovites e conjuntivites em casos crônicos (SHIVAPRASAD, 2012).

No local de aplicação do inóculo foi possível observar um processo inflamatório que se caracterizava por uma lesão amarelada presente no peritônio. Este mesmo tipo de lesão foi descrita por Pilatti (2014) em pintinhos de um dia inoculados com as mesmas cepas selecionadas para este estudo. Além da identificação desta alteração macroscópica, a autora também a considerou como uma das lesões para o cálculo do índice de patogenicidade. O baço também apresentou alteração. Havia congestão, esplenomegalia e tamanhos multivariados, entretanto, estas lesões não foram consideradas no cálculo dos IPs em consequência da dificuldade na sua identificação.

Um outro achado obtido com menor frequência foi a linfadenopatia, especificamente nos linfonodos subilíacos. Foram relatados apenas 5 casos desta lesão em cepas distintas, quatro de origem aviária e uma de origem suína. As cepas apresentavam IPs que variavam de médio a alto.

Foi possível observar também que os animais que apresentavam linfonodos aumentados mostravam um pequeno desconforto nos membros posteriores ao se

locomoverem. Randani *et al.* (1990), ao inocularem camundongos com cepas de *P. multocida* tipo B isoladas de ruminantes, observaram a morte de todos os animais em um curto período de tempo e lesões semelhantes a septicemia hemorrágica em bovinos, tais como linfadenopatia, esplenomegalia e hemorragia petequial, principalmente nos pulmões e no fígado de camundongos 12 a 24 horas após a infecção. A presença de linfadenopatia em cepas tipo B de alta patogenicidade em camundongos poderia sugerir uma relação entre este tipo de lesão com a capacidade patogênica da cepa envolvida, o que justificaria a mesma ter ocorrido com maior frequência em cepas aviárias. Outra questão destacada por Ahmed *et al.* (2014) aponta que quando a inoculação é realizada por via intraperitoneal, os locais primários para a colonização são o peritônio e o sistema linfático da região, posteriormente o microrganismo dissemina-se pelo corpo e migra até o tecido mais adequado para a sua multiplicação.

Todas estas lesões de distúrbios vasculares encontradas são normalmente relatadas em infecções por *P. multocida*, principalmente em quadros clínicos agudos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Hazarika *et al.* (2011) evidenciaram a presença de congestão e hemorragia em 100% dos pulmões e em 73,59% dos fígados e baços dos camundongos analisados. O autor considerou o pulmão, coração, fígado e baço como os melhores órgãos para a tentativa de resisolamento bacteriano.

De acordo com a distribuição da frequência de lesões conforme o período de observação no estudo, foi possível verificar o tempo necessário para a formação de algumas lesões. Do total de cepas analisadas, conjuntivite, pulmões e fígado congestos ou hemorrágicos foram observados nas primeiras 12 horas após a morte. Por outro lado, a lesão inflamatória no local de aplicação do inóculo somente foi observada 18 horas pós infecção e a pericardite apenas 42 horas após inoculação.

Com relação ao percentual de resisolamento, obteve-se um maior sucesso no resisolamento das cepas de origem aviária, as quais foram também mais patogênicas. Ozbey e Muz (2006) constataram 75% de mortalidade e de resisolamento bacteriano de cepas de origem aviária inoculadas em camundongos. Embora todos os camundongos tivessem sido inoculados com cepas de *P. multocida* previamente identificadas por cultura microbiológica

e PCR, 25% dos animais não morreram bem como não apresentaram reisolamento positivo. De acordo com o autor, é possível que as estirpes não reisoladas não fossem letais para camundongos, tendo em vista que quanto menor a virulência das cepas, maior a dificuldade de detectá-las neste modelo animal.

Em infecções pulmonares, diversos microrganismos podem estar envolvidos. O histórico da doença, sinais clínicos, bem como lesões macroscópicas não são suficientes para gerar diagnóstico definitivo da doença. A correlação entre os fatores envolvidos com o agente etiológico somente pode ser feita a partir do reisolamento da bactéria (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Na Tabela 3, é possível perceber que o período de morte inicial foi determinante para o aumento do número de amostras reisoladas. Nota-se que houve diferença no percentual de reisolamento bacteriano entre os camundongos que morreram nos primeiros dias comparado com os animais eutanasiados.

Tabela 3 - Relação entre o percentual de reisolamento bacteriano e o dia de reisolamento das cepas de *Pasteurella multocida* inoculadas em camundongos.

Dia	Mortalidade dos camundongos (N)	Reisolamento das cepas (N)	% Reisolamento
Dia 1	71	64	90,14%
Dia 2	93	76	81,72%
Dia 3	80	52	65%
Dia 4	37	26	70,27%
Dia 5	12	8	66,66%
Dia 6	10	4	40%
Dia 7	12	6	50%
Dia 7*	154	18	11,68%

7* = Camundongos que sobreviveram e foram eutanasiados no sétimo dia pós-inoculação.

Outros pesquisadores também constataram maior facilidade em recuperar amostras de animais que morreram em um período de 24 a 48 horas após serem inoculados com cepas de *P. multocida* de origem aviária (BALAKRISHAN; ROY, 2012). Um fator que

esta diretamente envolvido na dificuldade em reisolar o agente é a baixa capacidade patogênica de alguns isolados (KASTEN *et al.*, 1997; OZBEY; MUZ, 2006). Isto explica o fato das cepas suínas terem apresentado em sua maioria baixa mortalidade e maior presença de lesões, bem como reisolamento reduzido.

4.3 Índices de patogenicidade

A partir do experimento realizado foi possível identificar variações do índice de patogenicidade (IP) e assim, classificar as cepas de *P. multocida* de acordo com os grupos estabelecidos: IP Alta (8 a 10), Média (4 a 7) e Baixa (0 a 3). Na Tabela 4 observa-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as medianas dos IPs para as diferentes origens das cepas. O valor central entre as cepas aviárias foi representado pelo IP médio, já entre as cepas suínas, destacou-se o IP baixo.

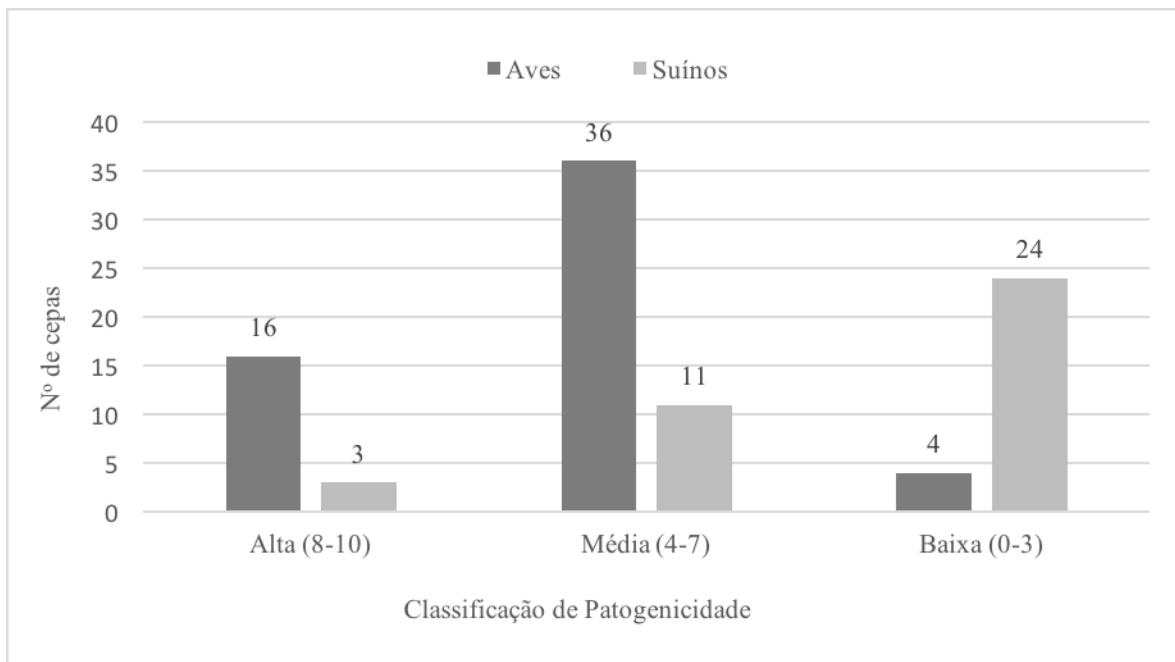
Tabela 4 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a origem das cepas de *Pateurella multocida*.

Origem	Nº de Amostras	Mediana \pm DP
Aves	56	6,63 \pm 2,076 ^a
Suínos	38	0,4 \pm 2,845 ^b

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($P < 0,001$).

No Gráfico 5 estão representadas as amostras distribuídas de acordo com a origem nos grupos de patogenicidade estabelecidos.

Gráfico 5 - Distribuição das cepas de *Pasteurella multocida* de acordo com a origem nos grupos de patogenicidade.



Nota-se que houve uma tendência entre as cepas de origem aviária em induzirem média a alta patogenicidade nos camundongos, ao contrário das cepas de origem suína que representaram em sua maioria os IPs médio e baixo. Conforme o objetivo proposto nesta pesquisa, o modelo animal utilizado proporcionou o estabelecimento de diferentes índices de patogenicidade para cepas de ambas as espécies de origem (APÊNDICE B). Nas Tabelas 5 e 6 são descritas as medianas dos grupos de patogenicidade conforme a origem das cepas.

Entre as 54 cepas aviárias analisadas, 16 foram classificadas como de alta patogenicidade, 36 de média e apenas 4 como de baixa patogenicidade. A análise estatística dos resultados demonstra que não houve diferença ($P > 0,05$) no IP entre as cepas de média e baixa patogenicidade, entretanto estes dois grupos diferiram do grupo de alta patogenicidade.

Tabela 5 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das cepas de origem aviária nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Alta	16	9,46 ± 1,061 ^a
Média	36	6,27 ± 0,903 ^b
Baixa	4	2,4 ± 1,575 ^b

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa (P<0,0001).

Já em relação às 38 cepas suínas selecionadas, apesar dos baixos valores revelados em sua maioria, 3 cepas foram classificadas como de alta patogenicidade, 11 como de média e 24 cepas como de baixa patogenicidade.

Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os grupos de patogenicidade alta e média, mas ambos foram distintos do grupo de baixa patogenicidade. A diferença pode ser justificada pelo pequeno número de cepas classificadas como de alta patogenicidade.

Tabela 6 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das cepas de origem suína nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Alta	3	7,83 ± 1,324 ^a
Média	11	5,74 ± 0,917 ^a
Baixa	24	0 ± 0,903 ^b

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa (P<0,0001).

Muitos estudos estão sendo realizados para um melhor entendimento a respeito da patogênese da *P. multocida* nos mais variados hospedeiros. Contudo, a inexistência de dados referentes à patogenicidade que classifiquem as cepas de maneira objetiva dificulta a comparação dos dados obtidos.

Entre as possíveis causas do baixo potencial de indução da doença em camundongos para a maioria das cepas de suínos, poderíamos destacar a origem dos isolados. As cepas

aviárias eram pertencentes a casos clínicos de CA, entretanto nas informações sobre a origem das cepas de origem suína não constavam se os isolados provenientes do matadouro-frigorífico eram originários de pulmões com ou sem lesão. A relação das cepas e suas respectivas origens estão descritas no APÊNDICE C.

Alguns fatores de virulência são considerados fundamentais apenas para uma espécie de hospedeiro. Por este motivo, algumas cepas são geneticamente capazes de induzir doença em um hospedeiro e não causarem doença em outros (EWERS *et al.*, 2006). A obtenção da classificação de alta patogenicidade para alguns isolados de suínos na atual pesquisa comprova o potencial patogênico de cepas desta origem em camundongos.

Além dessas questões citadas, *P. multocida* é o principal agente causador da CA (QUINN, 2005), mas nos suínos o microrganismo encontra-se presente geralmente em infecções mistas e por esta razão, sua atuação como um patógeno primário ou um invasor oportunista ainda é discutida (BOROWSKI *et al.*, 2007). Ciprian *et al.* (1988) corroboraram com este argumento ao observarem que os animais não desenvolveram sinais clínicos, lesões pulmonares, e ainda, não reisolaram a bactéria após inoculação experimental em suínos apenas com *P. multocida* como agente patogênico. Inoculando apenas *Mycoplasma hyopneumoniae*, os autores observaram moderadas lesões pulmonares. Porém, ao inocularem *M. hyopneumoniae* em conjunto com *P. multocida*, os autores observaram um significativo aumento no potencial patogênico, devido à capacidade de formação de graves lesões, somado ao reisolamento de ambos os agentes envolvidos.

Em um caso mais recente, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *P. multocida* foram detectados em maior frequência, dentre outros microrganismos relatados, em casos de doença respiratória em suínos na Dinamarca (HANSEN, 2010). Outros autores também relataram o aumento do potencial patogênico das cepas quando associadas a outros agentes (MORÉS *et. al.*, 2015).

Por outro lado, Oliveira Filho e colaboradores (2015) referem-se a este agente como causa primária de pneumonia em suínos após a reprodução de um estudo de infecção experimental. Com isso, os autores sugerem e destacam a importância da variabilidade genética das cepas que circulam entre os rebanhos suínos e sua influência sobre a

capacidade patogênica para os animais.

Diante destes relatos, é possível que assim como nos suínos, ocorra um aumento no potencial patogênico para os camundongos quando *P. multocida* atua em conjunto com outros microrganismos, entretanto a evidência de alguns IPs altos para cepas suínas evidencia a capacidade genética de cepas de *P. multocida* na indução de doença em camundongos, mesmo quando avaliadas como único agente etiológico.

O mesmo modelo de classificação de patogenicidade foi utilizado por Pilatti em 2014, a partir da inoculação experimental em pintos de um dia com as cepas selecionadas para esta pesquisa. A equação matemática utilizada foi eficiente na elucidação da patogenicidade das cepas. A autora observou diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os resultados dos IPs e distribuiu as cepas em grupos de classificação. Além disso, assim como no presente estudo, as cepas de origem aviária foram estatisticamente mais patogênicas que as cepas de origem suína.

Furian (2015) desenvolveu um método de interferência condicional através do emprego de árvores de classificação para 22 genes associados à virulência de *P. multocida*. O autor utilizou os IPs estabelecidos por Pilatti (2014) na correlação dos genes marcadores de patogenicidade. A partir deste trabalho, o autor conseguiu identificar entre os genes de virulência pesquisados aqueles associados aos níveis de patogenicidade em cepas aviárias.

Os dados gerados neste estudo serão fundamentais na caracterização da patogenicidade em trabalhos futuros e poderão originar modelos mais concretos de avaliação de patogenicidade. Além disso, servirão como base para o diagnóstico a partir do emprego de árvores de classificação, assim como descrito por Furian (2015), além de servir para a construção de modelos de classificação de patogenicidade selecionando-se redes neurais artificiais (SOUZA, 2010), sem a necessidade da utilização de modelos animais.

5 CONCLUSÃO

Diferenças estatísticas foram evidenciadas para os índices de patogenicidade estabelecidos e esta distribuição permitiu a classificação das cepas em grupos de patogenicidade alta, média e baixa.

O modelo experimental utilizado foi capaz de responder à infecção experimental e gerar índices de patogenicidade variáveis para cada cepa de ambas as origens, no entanto os isolados de origem aviária mostraram-se mais patogênicos para camundongos do que para os isolados de suínos.

A equação matemática utilizada com a presença de parâmetros como fator de bonificação de sobrevivência e lesões macroscópicas permitiram a avaliação da patogenicidade das cepas.

O estudo propôs uma metodologia mais consistente de mensuração e classificação. Os resultados obtidos servirão para gerar outros modelos não-lineares de avaliação da patogenicidade de *P. multocida*.

REFERÊNCIAS

AHMED, W. A.; AL GEBOURI, N. M.; AL MAALY, N.M. Study the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in mice. **Basrah Journal of Veterinary Research**, v. 1, n. 1, p. 312-323, Jan. 2014.

ALWIS, M. C. L. Haemorrhagic septicaemia - A general review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 2, p. 99-112, March./April, 1992.

AMARAL, P. F. G. P. Biosseguridade na criação de frangos de corte. **Enciclopédia biosfera**, v.10, n.18. p. 664-685, July 2014.

ANDREATTI FILHO, R.L. Cólera Aviária. *In*: _____. **Saúde Aviária e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 118-121.

ATASHPAZ, S. *et al.* Potential of *Pasteurella multocida* isolated from healthy diseased cattle and buffaloes in induction of diseases. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, n. 3, p. 299-304, Jan. 2010.

ATASHPAZ, S.; SHAYEGH, J.; HEJAZI, M.S. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 3, p. 355-357, Dec. 2009.

AVANTE, M. L. *et al.* Rinite atrófica dos suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. VI, n. 10, p. 1-7, Jan. 2008.

AKTAR, M. **Isolation, identification and characterization of *Pasteurella multocida* from chicken and development of oil based vaccine**. 2013. 12 n. Ms Thesis (Master of Science in Microbiology) - Faculty of veterinary science, Bangladesh agricultural university, mymensingh, June 2013.

ABPA. ABPA na mídia - Produção de carne de frango totaliza 13,146 milhões de toneladas em 2015. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. São Paulo, Jan. 2016. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146-milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

BISGAARD, M. Fowl Cholera. *In*: PATTISON, M.; MCMULLIN, P.F.; BRADBURY, J.M.; ALEXANDER, D. J. (Ed.). **Poultry Diseases**. 6.ed. Philadelphia: Saunders elsevier, 2008. p. 149-154.

BACK, A. Coriza Infecciosa. **Manual de Doenças de Aves**. 1.ed. Cascavel: Coluna do Saber, 2004. p. 31-33.

BOERLIN, P. Evolution of Bacterial Virulence. In: GYLES, C. L. *et al.* **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Blackwell Publishing. 1.ed. 2010. 33-50 p.

BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Journal of Biotechnology*, v.83, n. 1-2, p. 153-160, Sept. 2000.

BOYCE, J.D. *et al.* *Pasteurella*. In: GYLES, C.L; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, 4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 325-346.

BOROWSKI, S.M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no estado do Rio Grande do Sul**. 2001. 190 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BOROWSKI, S.M; BARCELLOS, D.; MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p. 177-181.

BALDRAIS, L.; FROST, A.J. AND BOYLE, D.O. Isolation of *Pasteurella-like* organisms from tonsillar region of dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29 p. 63-68, 1980.

BALAKRISHAN, G. e ROY, P. Isolation, identification and antibiograma of *Pasteurella multocida* isolates of avian origin. **Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 8, n. 4, p. 199-202, July 2012.

CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Fowl Cholera. **Revue Scientific et Technique**, v. 19, n. 2, p. 626–637, Aug. 2000.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. The genus *Pasteurella*. In: DWORKIN, M. (Ed.) **The Prokaryotes**. 3. ed. New York: Springer, 2006. p. 1062-1090.

CARTER, G.R. Studies on *Pasteurella multocida* I.A haemagglutination test for the identification of serological types. **American Journal of Veterinary Research**, v. 16, p. 481-484, July 1955.

CAPITINI, C. M. *et al.* Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. **Clinical Infectious Diseases**, v.

34, n. 12, p. 74–76, May. 2002.

CHARLTON, B.R. *et al.* Fowl cholera. In: _____. **Avian Disease Manual**. 6. ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, 2006. p. 84-87.

COLLINS, C.; FLANAGAN, B. & HENNING, J. S. An atypical presentation of a *Pasteurella multocida* infection following a cat bite: a case report. **Cutis**, v. 89, n. 6, p. 269-272, June 2012.

CHRISTENSEN, J.P. *et al.* Proposed minimal standards for the description of genera species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 166-178, Jan. 2007.

CARTER, G. R. Pasteurellosis: *pasteurella multocida* and *P. haemolytica*. **Advances Veterinary Science**, v. 11, p. 321-368, Jan. 1967.

CORNEY, B.G. *et al.* *Pasteurella multocida* detection by 5' Taq nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 376-380, May 2007.

COELHO, C. F. *et al.* Pericardite em suínos ao abate no Rio Grande Sul: avaliação de agentes bacterianos e lesões associadas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 643-648, July 2014.

CIPRIAN, A. *et al.* Mycoplasma hyopneumoniae increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 434 e 438, Oct. 1988.

DZIVA, F. *et al.* Diagnostic and typing options for investigatin disease associated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 1-22, Apr. 2008.

DeANGELIS, P.L. *et al.* Identification of the capsular polysaccharides of type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondoitin, respectively. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 17, p. 1547-1552, Sept. 2002.

DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBEL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.92, n. 1, p. 107-138, July 1966.

DOUGHTY, S.W.; RUFFOLO, C.G.; ADLER, B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 79-90, Mar. 2000.

EWERS, C. *et al.* Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 304-317, May 2006.

FRIEND, M. and FRANSON, J. C. Avian Cholera. *In: Field Manual of Wildlife Diseases - General field procedures and diseases of birds*. U. S. Geological Survey, Biological Resources Division information and Tecnology Report, 1999. p.75.

FERREIRA, T. S. P. **Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida* provenientes de animais de companhia**. 62 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FIOREZE, C. Asgav reelege diretoria de uma das principais cadeias produtivas do Estado. **Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação**, April. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.rs.gov.br/conteudo/6148/?Asgav_reelege_diretoria_de_uma_das_principais_cadeias_produtivas_do_Estado>. Acesso em: 5 jan. 2016.

FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; ROCHA, S. L. S.; RODRIGUES, E. E.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* isoladas em casos de cólera aviária através da técnica de multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.2, p. 177-182, Feb. 2013.

FURIAN, T. Q. **Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Pasteurella multocida***. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GLISSON, J.R. Pasteurellosis and others respiratory bacterial infection. *In: SAIF, Y.M.* (Ed.). **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 739-758.

GLORIOSO, J. C.; JONES, G. W.; RUSH, H. G. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. **Infection and immunity**, v.35, n. 3, p. 1105-1109, Mar. 1982.

GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F. Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms. *In: GYLES, et al.* **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ed. Blackwell: Publishing, 2010. p. 3-14.

GARBER, J. C. *et al.* Recommended Minimum Space for Commonly Used Laboratory Rodents Housed in Groups. *In: GARBER, J. C. et al.* Guide for the care and use of

laboratory animals. **National Research Council**. 8. ed Washington: Institute for Laboratory Animal Research, 2011. p. 57.

HATFALUDI, T. *et al.* Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2; p. 1-17, July 2010.

HUSSAINI, J. *et al.* Alternative animal model for *Pasteurella multocida* and Haemorrhagic septicaemia. **Biomedical Research**, v. 24, n. 2, p. 263-266, Feb. 2013.

HAZARIKA, M. P. *et al.* Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic pigs of Assam. **Indian Journal of Animal Research**, v. 44, n.4, p. 265-269, Dec. 2011.

HANSEN, M. S. *et al.* An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 120-131, Aug./Oct. 2010.

HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 1, p. 1-10, Dec. 2006.

HARPER, M. *et al.* *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: The long and the short of it. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 109-115, Nov. 2011a.

HARPER, M.; ST MICHAEL, F.; JOHN, M.; VINOGRADOV, E.; ADLER, B.; JD, B.; COX, A.D. *Pasteurella multocida* Heddleston serovars 1 and 14 express different lipopolysaccharide structures but share the same lipopolysaccharide biosynthesis outer core locus. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 289-296, June 2011b.

HEDDLESTON, K.L.; GALLAGHER, J.E.; REBERS, P.A. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. **Avian Diseases**, v. 16, n. 4, p. 925-936, July/Sept. 1972.

HUNKA, E. Biossegurança em granjas de postura comercial. **Avicultura Industrial**, Oct. 2015. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/biosseguranca-em-granjas-de-postura-comercial-por-eva-hunka/20151028085226_n_503>. Acesso em: 5 Jan. 2016.

IBGE. Indicadores IBGE. **Estatística de produção pecuária em 2015**. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e estatística, 2015. 18-22 p.

KONEMAM. Espécies de *Pasteurella* e *Mannheimia*. In: WINN, JR. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2008. p. 453-459.

- KUMAR, J. K.; REDDY, P. H.; DEVI, M. C. Isolation and Partial characterization of *Pasteurella multocida* from poultry farms around Tirupati. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 393-395, July 2012.
- KUBATZKY, K. F. *Pasteurella multocida* and Imunne Cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 53-72, Mar. 2012.
- KASTEN, R. W. *et al.* Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by the use of the polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 676-682, Jul./Sep. 1997.
- LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L. Pasteureloses Aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Ed.). **Saúde aviária e doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p.122-125.
- LAX, A.J.; CHANTER, N. Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. **Journal of General Microbiology**, v.136, n. 1, p.81-87, Jan. 1990.
- LICHTENSTEIGER, C. A. *et al.* Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurela multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 3035-3039, July. 1996.
- MORÉS M. A. Z. *et al.* Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 725-733, Aug. 2015.
- MARKEY, B. *et al.* Bacteriology. In: MARKEY, B. *et al.* Clinical Veterinary Microbiology. 2 ed. 2013. p. 307-312.
- MUHAIRWA, A. P., CHRISTENSEN, J. P., BISGAARD, M. Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. **Avian Pathology**, v. 29, n. 2, p. 133–142, Apr. 2000.
- MOHAMED, M. A.; MOHAMED, M. W. AND AHMED, A. I. *P. multocida* in backyard chickens in Upper Egypt: incidence with polymerase chain reaction analysis for capsule type, virulence in chicken embryos and antimicrobial resistance. **Veterinária Italiana**, v. 48,n. 1, p. 77-86, Jan. 2012.
- MADIGAN, M. T. *et al.* Princípios de Genética Bacteriana. In: MADIGAN, M. T. *et al.* Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 278-309.

NAGAI, S.; SOMENO, S.; YAGIHASHI, T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1004-1010, Apr. 1994.

NASCIMENTO, V.P.; GAMA, N.M.S.Q.; CANAL, C.W. Coriza infecciosa das galinhas, pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. *In*: BERCHIERI JÚNIOR, A. *et al* (Ed.). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 503-530.

NAGATA, H. *et al*. Acute cholecystitis with bacteremia caused by *Pasteurella multocida*. **Surgical Infections**, v. 15, n. 1, p. 1-3, Feb. 2014.

OZBEY, G.; MUZ, A. Isolation of aerobic bacteria from the lungs of chickens showing respiratory disorders and confirmation of *Pasteurella multocida* by polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Archives**, v. 76, n. 3, p. 217-225, June. 2006.

OKERMAN, L.; SPANOGHE, L.; DE BRUYCKER, R.M. Experimental infections of mice with *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, n. 1, p. 51-55, Jan. 1979.

OLIVEIRA FILHO, J. X. *et al*. *Pasteurella multocida* type A as the primary agent of pneumonia and septicaemia in pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 716-724, Aug. 2015.

PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. *In*: LEMAN, A. (Eds) Diseases of swine. 8. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1999. p. 511-520.

PANNA, S. N. *et al*. Isolation and molecular detection of *Pasteurella multocida* Type A from naturally infected chickens, and their histopathological evaluation in artificially infected chickens in Bangladesh. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 2, n. 3, p. 338-345, Sept. 2015.

PILATTI, R. M. **Estabelecimento de um índice de patogenicidade em pintos de corte de um dia de idade para amostras de *Pasteurella multocida* de aves e suínos**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PIFFER, I. A.; CASTRO, A. F. P. Capacidade hemaglutinante de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos e sua associação com fimbria e dermatotoxicidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 443-454, Oct. 1993.

PULLINGER, G.D.; BEVIR, T.; LAX, A.J. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 255-269, Jan. 2004.

QUINN, P. J. *et al.* Gênero *Pasteurella* e a *Mannheimia haemolytica*. In: QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto alegre: Artmed, 2005. p. 143-148.

RANDANI, H. J. S. *et al.* *Pasteurella multocida* infections in mice with reference to haemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. **Immunology & Cell Biology**, v. 68, n. 1, p. 57-61, Feb. 1990.

SHIVAPRASAD, H. L. A. Pathology of Birds – Na Overview. **Avian Pathology Seminar**. Presented at C. L. Davis Foundation Conference on Gross Morbid Anatomy of Animals, AFIP, Washington, The Royal College of Pathologists. 2012. p. 01-103.

RIMLER R.B. & GLISSON J.R. Fowl cholera. In: CALNEK, B. W. *et al.* **Diseases of poultry**. 10. ed. Iowa State University Press: Ames, 1997. p. 143-161.

RAJINI, R. *et al.* Studies on avian pasteurellosis in Andhra Pradesh. **Indian Veterinary Journal**, v. 72, p. 115-118. 1995.

REGISTER, K. B. *et al.* Pasteurellosis. In: ZIMMERMAN, J. J. *et al.* (eds) **Diseases of Swine**, 10. ed. Blackwell Publishing, 2012. p. 106-118.

SOUZA, G.F. **Estabelecimento de um novo índice de patogenicidade para amostras de *E. coli* e o uso de redes neurais artificiais**. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SOTOODEHNIA, A.; ATAEI, S.; MOAZENI, G. R.; JABBARI, A. R. AND TABATABAEI, M. Virulence of avian serotype A1 *Pasteurella multocida* for chickens and mice. **Archive of Razi institute**, v. 58, n. 1, p.91-96, Sep. 2004.

SIRCILI, M. P.; TRABULSI, L. R. Fatores de Virulência I: Adesão, Invasão e Sideroforos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.143-148.

SESTI, L. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. 2004. Chapecó, SC. **Anais**, Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, April. 2004. p. 55-72.

TRIGO, E.; PIJOAN, C. Presence of pili in *pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. **Veterinary Record**, v. 122, n. 1, p. 19, Jan. 1988.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2014**. São Paulo: UBABEF, 2014. 13-43 p.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WILKIE, I. W.; HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v. 361, n. 1-22, p. 1-22. 2012.

APENDICE A – Protocolo de aprovação CEUA/IPVDF.



Secretaria da Agricultura,
Pecuária e Agronegócio



Ofício n.º 08/15 – CEUA/IPVDF

Eldorado do Sul, 17 de março de 2015.

Senhora Pesquisadora:

Com relação ao Projeto de Pesquisa – ESTABELECIMENTO DE UM ÍNDICE DE PATOGENICIDADE PARA AMOSTRAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE AVES E SUÍNOS ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS – protocolado para análise e parecer sob n.º. 01/2015, por Brunna Dias de Emery, em 07 de janeiro de 2015, cabe referir o seguinte:

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IPVDF) reuniu-se extraordinariamente em 08 de janeiro e ordinariamente em 03 de março de 2015, no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e, após as solicitações feitas terem sido atendidas, emite **PARECER FAVORÁVEL** à respectiva pesquisa a ser desenvolvida, em 500 camundongos, cuja parte experimental abrange março a julho de 2015.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Atenciosamente,

P/ *Alexandra Silveira*
Fernando Sérgio Castilhos Karam
Coordenador CEUA - IPVDF

APENDICE B – Distribuição das cepas de *Pasteurella multocida* e seus respectivos índices de patogenicidade.

AVES		IP			SUINOS		IP
A-729/08	10	828	6,07	PMPI21	10		
ATCC 15742	10	A-1163/07	6,05	PMPI23	7,83		
PM 1218	10	802	6,04	FII9PM	7,6		
A-1139/08	10	812	5,81	S-130/08	6,69		
794	10	P7 03/09	5,79	PM 710	6,47		
A-514/08	10	PM 1308	5,54	IPV 2554	6,44		
1788711-2	10	A-40/08	5,37	CP12 0797	6,28		
1788711-1	9,46	A-130/09	5,19	PMFII14CAM	6,15		
MA 570/98	9,46	800	5,16	PIV1	5,74		
A-777/08	8,86	822	5,01	S-113/09	5,02		
A-1821/08	8,35	817	4,72	S-192/03	4,97		
17	8,19	826	4,64	PM 1/95	4,78		
1788714-2	7,64	A-524/08	4,4	S-08/03	4,78		
806	7,57	825	3,74	PROT1989	3,89		
1788711-3	7,5	804	3,4	IPV 717	3,46		
853	7,5	821	3,17	prot 1924(12)	3,08		
ATCC 12945	7,39	A-1219/08	1,64	cambrasil	0,6		
818	7,38	CP12 0720	0	PMP117	0,6		
819	7,24			P2PM	0,4		
A-931/08	7,21			ATCC12946	0,4		
155B	7,19			PM759	0,4		
A-971/08	7,04			PI33	0,4		
23	7,01			PII8	0,4		
850	6,96			PIII9PM	0,2		
PM 651	6,94			PM43	0,2		
1788714-1	6,74			798	0		
155A	6,69			PM76	0		
852	6,67			JAVA 1354	0		
824	6,55			PMCI2	0		
823	6,59			PM1628	0		
809	6,5			S-168/04	0		
A-601/08	6,47			PM1621	0		
155A 03/09	6,46			PMP115	0		
851	6,36			PMPIII4	0		
PM 1543	6,19			frangosul	0		
650	6,16			CII4	0		
PM 649	6,16			P313	0		
801	6,1			PIII20PM	0		

APENDICE C – Origem, condições do hospedeiro e ano de isolamento das 94 cepas de *Pasteurella multocida* selecionadas para o estudo.

Número	Origem	Condição do hospedeiro	Ano de isolamento
1	Galinha	Caso clínico de CA	2009
2	Galinha	Caso clínico de CA	ND
3	Galinha	Caso clínico de CA	ND
4	Galinha	Caso clínico de CA	ND
5	Galinha	Caso clínico de CA	ND
6	Galinha	Caso clínico de CA	2009
7	Galinha	Caso clínico de CA	ND
8	Galinha	Caso clínico de CA	ND
9	Galinha	Caso clínico de CA	ND
10	Galinha	Caso clínico de CA	2008
11	Galinha	Caso clínico de CA	2008
12	Galinha	Caso clínico de CA	2008
13	Galinha	Caso clínico de CA	2008
14	Galinha	Caso clínico de CA	2008
15	Galinha	Caso clínico de CA	2008
16	Galinha	Caso clínico de CA	2008
17	Galinha	Caso clínico de CA	2008
18	Galinha	Caso clínico de CA	2008
19	Galinha	Caso clínico de CA	2009
20	Galinha	Caso clínico de CA	2008
21	Galinha	Caso clínico de CA	2008
22	Galinha	Caso clínico de CA	2008
23	Galinha	Caso clínico de CA	2008
24	Galinha	Caso clínico de CA	2007
25	Galinha	Cepa padrão	ND
26	Galinha	Caso clínico de CA	2002
28	Galinha	Caso clínico de CA	1996
29	Galinha	Caso clínico de CA	2002
30	Galinha	Caso clínico de CA	2000
31	Galinha	Caso clínico de CA	1993

(continuação)

Número	Origem	Condição do hospedeiro	Ano de isolamento
32	Galinha	Caso clínico de CA	1994
33	Galinha	Caso clínico de CA	1994
34	Galinha	Caso clínico de CA	1994
35	Galinha	Caso clínico de CA	1994
36	Galinha	Caso clínico de CA	1994
37	Galinha	Caso clínico de CA	1994
38	Galinha	Caso clínico de CA	2001
39	Galinha	Caso clínico de CA	2011
40	Galinha	Caso clínico de CA	2011
41	Galinha	Caso clínico de CA	2011
42	Galinha	Caso clínico de CA	2011
43	Galinha	Caso clínico de CA	2011
44	Galinha	Caso clínico de CA	ND
45	Galinha	Caso clínico de CA	ND
46	Galinha	Caso clínico de CA	ND
47	Galinha	Caso clínico de CA	ND
48	Galinha	Caso clínico de CA	ND
49	Galinha	Caso clínico de CA	ND
50	Peru	Caso clínico de CA	1998
51	Peru	Caso clínico de CA	1962
52	Ave*	Caso clínico de CA	1994
53	Ave*	Caso clínico de CA	2002
54	Ave*	Caso clínico de CA	1999
55	Ave*	Caso clínico de CA	1999
56	Ave*	Caso clínico de CA	1999
57	Suíno	Frigorífico	1997
58	Suíno	Frigorífico	ND
59	Suíno	Frigorífico	ND
60	Suíno	Frigorífico	1998
61	Suíno	Frigorífico	1996

(continuação)

Número	Origem	Condição do hospedeiro	Ano de isolamento
62	Suíno	Frigorífico	1998
64	Suíno	Frigorífico/Pneumonia	1997
65	Javali	Frigorífico	1997
66	Suíno	Frigorífico	1997
67	Suíno	Frigorífico	1998
69	Suíno	Frigorífico	1997
70	Suíno	Frigorífico/Pneumonia	ND
71	Suíno	Frigorífico	1996
72	Suíno	Frigorífico	1997
73	Suíno	Frigorífico	1995
74	Suíno	Frigorífico/Pneumonia	1997
75	Suíno	Frigorífico	2004
76	Suíno	Frigorífico	2004
77	Suíno	Frigorífico	2003
78	Suíno	Frigorífico	2009
79	Suíno	Frigorífico	2003
80	Suíno	Frigorífico	2008
81	Suíno	Frigorífico	1997
82	Suíno	Frigorífico	1995
83	Suíno	Frigorífico/Pneumonia	ND
84	Suíno	Frigorífico	ND
86	Suíno	Frigorífico	ND
87	Suíno	Frigorífico	ND
88	Suíno	Frigorífico	ND
89	Suíno	Frigorífico	ND
90	Suíno	Frigorífico	ND
91	Suíno	Frigorífico	ND

(conclusão)

Número	Origem	Condição do hospedeiro	Ano de isolamento
92	Suíno	Frigorífico	1995
93	Suíno	Frigorífico	1995
94	Búfalo	-	-

*Espécie não identificada