

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de cólera aviária nos Estados Unidos e avaliação do emprego de cartões FTA para o transporte do DNA bacteriano**

Autora: Camila Neves de Almeida

**PORTO ALEGRE**

**2015/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de cólera aviária nos Estados Unidos e avaliação do emprego de cartões FTA para o transporte do DNA bacteriano**

Autora: Camila Neves de Almeida

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para a obtenção da graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

Co-orientador: Thales QuediFurian

**PORTO ALEGRE**

**2015/2**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar serenidade e me iluminar durante todos os momentos.

À minha mãe Jandira que me proporcionou todo o amor, educação e valores que foram as bases para as minhas escolhas.

Ao meu pai Adalberto pelo amor e por todo esforço e apoio durante a minha formação.

Agradeço à minha tia Elizete por todo amor, carinho, compreensão e paciência dispensados a mim quando mais precisei. Agradeço também pela amizade incondicional e por ser um modelo de caráter e dignidade que sempre tentarei seguir.

À minha avó Elvira por sempre me acolher com muito amor e pelo exemplo de força, alegria e positividade em todas as situações.

Ao meu namorado Alan por todo amor, apoio, estímulo e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos pelo apoio e compreensão, principalmente a Bruna por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes pelos ensinamentos e pela ajuda.

Ao meu co-orientador Thales Quedi Furian pela amizade, pela paciência, por todo conhecimento compartilhado e principalmente pela confiança em mim e no meu trabalho.

Aos professores, pós-graduandos e funcionários do CDPA pelo aprendizado e ajuda durante o meu tempo de estágio. Em especial, a Karen, pela amizade e pelos ensinamentos.

À Lolly e Tina, minhas cachorras, que me mostraram todo companheirismo e amor incondicional que os animais são capazes de nos dar.

## RESUMO

A Cólera Aviária (CA) é uma doença contagiosa causada pela bactéria Gram-negativa *Pasteurella multocida*. Ocorre geralmente de forma aguda e com altas taxas de morbidade e mortalidade. A severidade dos casos clínicos é em parte justificada pela presença de fatores de virulência que diferem os microrganismos. As principais estruturas associadas à virulência e identificadas em cepas de *P. multocida* são a cápsula e o lipopolissacarídeo. Entretanto, outros fatores podem ser relacionados à capacidade do agente em infectar o hospedeiro, assim como de sobreviver em um ambiente hostil. Exemplos são os genes que codificam estruturas como fímbrias e adesinas (*ptfA*, *pfhA*) ou proteínas de membrana externa (*oma87*). Também há os genes envolvidos em processos metabólicos, como sialidases (*nanH*, *nanB*) ou dismutases (*sodA*, *sodC*) e proteínas associadas ao transporte e ao metabolismo do ferro (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*). Os cartões FTA (*Flinders Technology Associates FilterPaper* - WHATMAN®) foram desenvolvidos para o transporte seguro de microrganismos inativados, podem ser armazenados e posteriormente utilizados em análises moleculares. Estes têm sido empregados para a coleta e transporte de amostras de alguns vírus e bactérias de interesse na área de sanidade avícola. Os objetivos do estudo foram avaliar a viabilidade do transporte de DNA de *P. multocida* através do emprego de cartões FTA e detectar quatorze genes associados à virulência em 27 cepas isoladas de CA nos Estados Unidos. Nenhuma das amostras coletadas para análise microbiológica a fim de avaliar a segurança dos cartões FTA apresentou crescimento de microrganismos. A extração e confirmação da presença do DNA de *P. multocida* foram possíveis em 100% (27/27) das amostras analisadas. Entre os genes de virulência pesquisados, *ptfA*, *exbd-tonB*, *hgbA*, *nanB*, *oma87* e *hyaD-hyaC* foram detectados em 100% (27/27) das cepas. Os genes *sodC* e *hgbB* em 96,3% (26/27), *sodA* em 92,6% (25/27), *nanH* em 85,2% (23/27) e *pfhA* em 81,5% (22/27). Os genes *dcbF*, *bcbD* e *toxA* não foram identificados em nenhuma das cepas pesquisadas. A partir dos resultados obtidos, os cartões FTA demonstraram ser uma ferramenta viável e segura para o transporte do DNA de *P. multocida*. Da mesma forma, a maioria dos genes pesquisados apresentou uma alta frequência, compatível com isolados obtidos de casos clínicos de CA.

**Palavras-chave:** *Pasteurella multocida*, cólera aviária, cartões FTA, genes de virulência.

## **ABSTRACT**

*Fowl Cholera (FC) is a contagious disease caused by Gram-negative bacteria Pasteurella multocida. It usually occurs in an acute form with high rates of morbidity and mortality. The severity of clinical cases is in part justified by the presence of virulence factors which differs microorganisms. The main structures associated with virulence and identified in P. multocida are the capsule and lipopolysaccharide. However, other factors may be related to the agent's ability to infect the host, as well as to survive in a hostile environment. Examples are genes encoding structures such as fimbriae and adhesins (ptfA, pfhA) or outer membrane proteins (oma87). There are also genes involved in metabolic processes, as sialidases (nanH, nanB) or dismutases (sodA, sodC) and proteins associated with transport and iron metabolism (hgbA, hgbB, exBD-tonB). FTA cards (Flinders Technology Associates Filter Paper - WHATMAN®) were developed for safe transportation of inactivated microorganisms. They can be stored and later used in molecular analysis. These cards have been used to collect and carry samples of some viruses and bacteria of interest in poultry health. The objectives of the study were to evaluate the viability of transporting P. multocida DNA through the use of FTA cards and detect fourteen genes associated with virulence in 27 strains isolated from FC in the United States. None of the samples collected from microbiological analysis in order to assess the safety of FTA cards showed any growth. The extraction and confirmation of P. multocida presence were possible in 100% (27/27) of the samples. Among the virulence genes studied, ptfA, exBD-tonB, hgbA, nanB, oma87 e hyaD-hyaC were detected in 100% (27/27) of the strains. The sodC e hgbB genes were present in 96.3% (26/27), sodA in 92.6% (25/27), nanH in 85.2% (23/27) and pfhA in 81.5% (22/27). The dcbF, bcbD and toxA genes have not been identified in any of the studied strains. From the results obtained, the FTA cards have proven to be a safe and viable tool for P. multocida DNA transportation. Likewise, most of the studied genes showed a high frequency, compatible with strains obtained from clinical cases of FC.*

**Key words:** *Pasteurella multocida, fowl cholera, FTA cards, virulence genes.*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Distribuição dos 14 genes de virulência nas cepas de <i>Pasteurella multocida</i> isoladas de casos de cólera aviária nos Estados Unidos detectados por multiplex-PCR. ....	17
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Coleta dos discos dos cartões FTA (A). Disco coletado em caldo BHI para avaliar a segurança dos cartões FTA (B).....	15
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APINCO	Associação Brasileira de Produtores de Pinto de Corte
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> – Infusão Cérebro-Coração
CA	Cólera Aviária
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FTA	<i>Flinders Technology Associates</i>
kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
ng	Nanograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de base
PMT	<i>Pasteurella multocida Toxin</i>
PIB	Produto Interno Bruto
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
µL	Microlitro



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>ARTIGO</b> .....	11
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	24
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25

## 1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa lugar de destaque no cenário mundial. Segundo dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF) de 2014, o Brasil é o maior exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor mundial do setor. O desenvolvimento contínuo da avicultura contribui para a sua significativa participação na economia brasileira.

De acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Pintos de Corte (APINCO), a produção nacional de carne de frango em 2014 foi de aproximadamente 12,9 milhões de toneladas, correspondendo a um crescimento de 3% em relação ao ano anterior (AVEWORLD, 2015). Da produção avícola total, 67,7% são destinados ao mercado interno para suprir o consumo per capita de 43,8 kg por habitante no país (ABPA, 2015). No ano de 2014 foram exportados 4,1 milhões de toneladas do produto, representando um crescimento de 1% em relação ao ano de 2013 (ABPA, 2015). O Brasil apresenta uma participação em torno de 15% da produção avícola internacional (USDA, 2014). As exportações nacionais tendem a crescer 3% no ano de 2015, devido ao interesse de novos mercados consumidores, como a Rússia e a Venezuela (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014; UBABEF, 2014).

A importância socioeconômica da avicultura na economia brasileira é representada pelos números do setor. A produção avícola é responsável por mais de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, e corresponde a 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (UBABEF, 2014).

O aumento constante da produção agrícola resulta em consequente intensificação da avicultura industrial. Os sistemas de criação baseados na alta densidade populacional aumentam os riscos de disseminação de doenças infecciosas, principalmente as respiratórias e aquelas em que os agentes etiológicos possuem mais de um hospedeiro. A bactéria *Pasteurella multocida* é o agente etiológico da cólera aviária (CA), doença que geralmente ocorre de forma aguda, septicêmica e com altos índices de morbidade e mortalidade. Afeta aves domésticas, aquáticas e silvestres de todas as idades, sendo os animais entre 16 a 40 semanas os mais suscetíveis (NASCIMENTO, 2009). A CA deve ser considerada no diagnóstico diferencial de doenças com notificação obrigatória que apresentam morte súbita, como influenza aviária e doença de Newcastle (GLISSON, 2008). Além disto, a *P. multocida* é causadora de outras diversas doenças nos animais de produção que podem trazer prejuízos econômicos. Este microrganismo parasita o epitélio da cavidade oral e do trato respiratório superior de animais sadios, mas também pode agir como agente secundário em outras

enfermidades (ANDREATTI FILHO, 2007; NASCIMENTO, 2009). A gravidade e a incidência da infecção causada por *P. multocida* depende de fatores associados ao hospedeiro – incluindo espécie e idade das aves infectadas - associados ao ambiente e também à virulência da cepa envolvida (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000).

A *P. multocida* é uma bactéria Gram negativa que pertence à família *Pasteurellaceae*. Atualmente, esta família é formada por dezenove gêneros, entre eles, destacam-se os gêneros *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus* e *Avibacterium* (PARTE, 2014). Apesar da importância da CA, tanto a patogenia quanto os fatores de virulência envolvidos nos processos infecciosos ainda estão pouco esclarecidos (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). Além da importância da obtenção do DNA bacteriano para a pesquisa de tais genes de virulência, o material genético é fundamental para o diagnóstico de CA, especialmente para a diferenciação de doenças de notificação obrigatória, o que implica na necessidade de um diagnóstico rápido e no transporte seguro do material para o laboratório (PEROZO *et al.*, 2006; KRAUSS *et al.*, 2009). Da mesma forma, o transporte deste material para o diagnóstico laboratorial é regulamentado por normas internacionais geralmente complexas (WHO, 2007; BRASIL, 2009). Os objetivos deste estudo foram avaliar a viabilidade do transporte de DNA de *P. multocida* através do emprego de cartões FTA (*Flinders Technology Associates Filter Paper - WHATMAN*<sup>®</sup>) e detectar quatorze genes associados à virulência em 27 cepas isoladas de CA nos Estados Unidos.

## 2 ARTIGO

### **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de cólera aviária nos Estados Unidos e avaliação do emprego de cartões FTA para o transporte do DNA bacteriano**

Camila N. de Almeida<sup>1</sup>, Thales Q. Furian<sup>1</sup>, Karen A. Borges<sup>1</sup>, Silvio L. S. da Rocha<sup>1</sup>, Vladimir P. do Nascimento<sup>1</sup>, Carlos T. P. Salle<sup>1</sup>, Hamilton L.S. Moraes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP: 91540-000

#### **Resumo**

A Cólera Aviária (CA) é uma doença contagiosa causada pela bactéria Gram-negativa *Pasteurella multocida*. Ocorre geralmente de forma aguda e com altas taxas de morbidade e mortalidade. A severidade dos casos clínicos é em parte justificada pela presença de fatores de virulência que diferem os microrganismos. As principais estruturas associadas à virulência e identificadas em cepas de *P. multocida* são a cápsula e o lipopolissacarídeo. Entretanto, outros fatores podem ser relacionados à capacidade do agente em infectar o hospedeiro, assim como de sobreviver em um ambiente hostil. Exemplos são os genes que codificam estruturas como fímbrias e adesinas (*ptfA*, *pfhA*) ou proteínas externas de membrana (*oma87*). Também há os genes envolvidos em processos metabólicos, como sialidases (*nanH*, *nanB*) ou dismutases (*sodA*, *sodC*) e proteínas associadas ao transporte e ao metabolismo do ferro (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*). Os cartões FTA foram desenvolvidos para o transporte seguro de microrganismos inativados, podem ser armazenados e posteriormente utilizados em análises moleculares. Estes têm sido empregados para a coleta e transporte de amostras de alguns vírus e bactérias de interesse na área de sanidade avícola. Os objetivos do estudo foram avaliar a viabilidade do transporte de DNA de *P. multocida* através do emprego de cartões FTA e detectar quatorze genes associados à virulência em 27 cepas isoladas de CA nos Estados Unidos. Nenhuma das amostras coletadas para análise microbiológica, a fim de avaliar a segurança dos cartões FTA, apresentou crescimento de microrganismos. A extração e confirmação da presença do DNA de *P. multocida* foram possíveis em 100% (27/27) das

amostras analisadas. Entre os genes de virulência pesquisados, *ptfA*, *exbd-tonB*, *hgbA*, *nanB*, *oma87* e *hyaD-hyaC* foram detectados em 100% (27/27) das cepas. Os genes *sodC* e *hgbB* em 96,3% (26/27), *sodA* em 92,6% (25/27), *nanH* em 85,2% (23/27) e *pfhA* em 81,5% (22/27). Os genes *dcbF*, *bcbD* e *toxA* não foram identificados em nenhuma das cepas pesquisadas. A partir dos resultados obtidos, os cartões FTA demonstraram ser uma ferramenta viável e segura para o transporte do DNA de *P. multocida*. Da mesma forma, a maioria dos genes pesquisados apresentou uma alta frequência, compatível com isolados obtidos de casos clínicos de CA.

**Palavras-chave:** *Pasteurella multocida*, cólera aviária, cartões FTA, genes de virulência.

## Introdução

A Cólera Aviária (CA) é uma doença contagiosa causada pela bactéria Gram-negativa *Pasteurella multocida*. A enfermidade ocorre geralmente na forma septicêmica e resulta em altas taxas de morbidade e de mortalidade (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Além disto, a *P. multocida* é um habitante comum das vias aéreas de animais e o desequilíbrio da relação entre o hospedeiro e a bactéria pode ocasionar diferentes graus de manifestação da enfermidade (SAMUEL; BOTZLER; WOBESER, 2007; GLISSON *et al.*, 2008). A severidade dos casos é em parte justificada pela presença de fatores de virulência que diferem os microrganismos de uma espécie (VIEIRA, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010). As principais estruturas associadas à virulência e identificadas em cepas de *P. multocida* são a cápsula e o lipopolissacarídeo (LPS) (HARPER *et al.*, 2006). Assim, a bactéria pode ser classificada em cinco sorogrupos (A, B, D, E e F) conforme a presença de antígenos capsulares e em 16 sorotipos conforme a distribuição dos antígenos somáticos (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Esta classificação é utilizada para investigar a diversidade das cepas, assim como para estudos sobre a patogenia e epidemiologia do agente (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). Sugere-se uma possível inter-relação entre o tipo capsular, a patogenia e a predisposição do hospedeiro a um sorogrupo particular (CHUNG; ZHANG; ADLER, 1998).

Entretanto, outros diversos fatores podem ser relacionados à capacidade do agente em infectar o hospedeiro, assim como de sobreviver em um ambiente hostil (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; BOYCE *et al.*, 2010; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). O recente sequenciamento do genoma de nove cepas de *P. multocida* permitiu a identificação de genes possivelmente associados à virulência, representando um primeiro passo para esclarecer os mecanismos moleculares que envolvem a patogenia desta bactéria (BOYCE *et al.*, 2012).

A partir da análise do genoma da cepa Pm70, mais de 100 genes provavelmente envolvidos na virulência do microrganismo foram identificados (MAY *et al.*, 2001). Assim, alguns trabalhos que têm como objetivo a determinação da frequência e de padrões genéticos de virulência foram desenvolvidos nos últimos anos e podem contribuir para elucidar a patogenia da CA, por exemplo, associando-se genes específicos ao desenvolvimento da doença na forma aguda ou crônica (EWERS *et al.*, 2006; ATASHPAZ; SHAYEGH; HEJAZI, 2009; BETHE *et al.*, 2009; SHAYEGH *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009, FURIAN *et al.*, 2013; RAJKHOWA, 2015).

Exemplos são os genes que codificam estruturas como fímbrias e adesinas (*ptfA*, *pfhA*), proteínas de membrana externa (*oma87*) e a exotoxina dermonecrótica (*toxA*) (EWERS *et al.*, 2006; CORNEY *et al.* 2007; HATFALUDI *et al.*, 2010). A maioria dos genes que aumenta a transcrição durante o processo infeccioso também estão envolvidos na aquisição de nutrientes e em processos metabólicos (BOYCE; ADLER, 2006). Cepas altamente virulentas frequentemente secretam enzimas hidrolíticas, como sialidases (*nanH*, *nanB*), além de dismutases (*sodA*, *sodC*) e de proteínas associadas ao metabolismo do ferro (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*) (MIZAN *et al.* 2000; COX *et al.* 2003; EWERS *et al.*, 2006; GUENTHER *et al.*, 2008; BETHE *et al.*, 2009; WILSON; HO, 2013).

Além da importância da obtenção do DNA bacteriano para a pesquisa de genes de virulência, o material genético é fundamental para o diagnóstico e tipificação molecular de CA, especialmente se considerada a dificuldade de isolamento do agente nas aves e a limitação da sobrevivência do microrganismo fora do hospedeiro ou em meios artificiais (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006, DZIVA *et al.*, 2008). Também a forma aguda de CA deve ser diferenciada de doenças de notificação obrigatória, como influenza aviária e doença de Newcastle (GLISSON, 2008), o que implica na necessidade de um diagnóstico rápido e no transporte seguro do material para o laboratório (PEROZO *et al.*, 2006; KRAUSS *et al.*, 2009). O transporte de material biológico é regulamentado por normas, internacionais e de cada país, geralmente complexas (WHO, 2007; BRASIL, 2009).

Uma alternativa segura para o transporte de microrganismos inativados seriam os cartões FTA (*Flinders Technology Associates Filter Paper* - WHATMAN®), os quais são quimicamente tratados com substâncias que lisam a célula e desnaturam as proteínas (SMITH; BURGOYNE, 2004; PEROZO *et al.*, 2006; CORTES *et al.*, 2009). Por outro lado, os ácidos nucleicos ficam retidos nos cartões e protegidos de oxidação, danos por raios UV, além de poderem ser estocados em temperatura ambiente (PEROZO *et al.*, 2006; CORTES *et al.*, 2009). Assim, cartões FTA foram empregados em distintos estudos para o transporte de

amostras de vírus e bactérias patogênicas em aves para posterior detecção por PCR ou RT-PCR (MOSCOSO *et al.*, 2004; MOSCOSO *et al.*, 2005; MOSCOSO *et al.*, 2006; PEROZO *et al.*, 2006; CORTES *et al.*, 2009; LANDÍNEZ-PULIDO *et al.*, 2012; AWAD *et al.*, 2014).

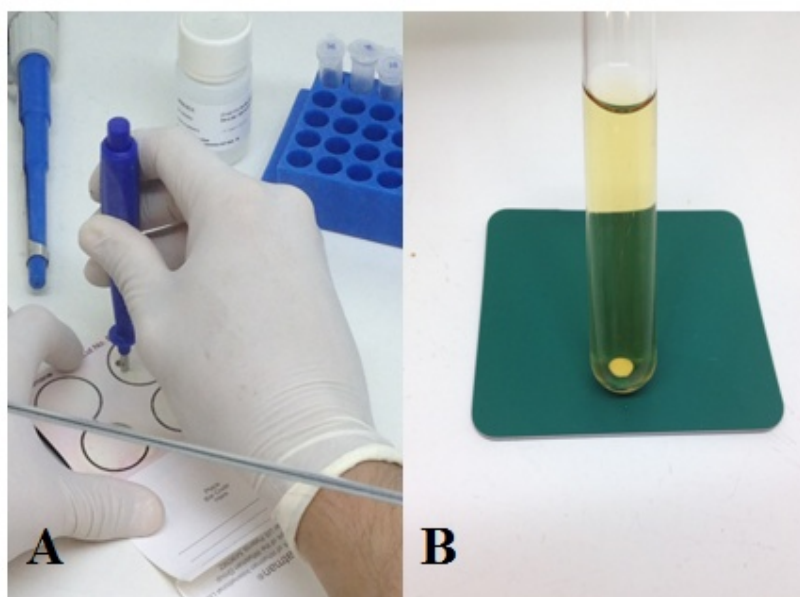
Os objetivos do estudo foram avaliar a viabilidade do transporte de DNA de *P. multocida* através do emprego de cartões FTA e detectar quatorze genes associados à virulência em 27 cepas isoladas de CA nos Estados Unidos.

## **Materiais e Métodos**

Um total de 27 cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de casos clínicos de CA em aves reprodutoras nos Estados Unidos foi selecionado para o estudo. As cepas encontravam-se estocadas a uma temperatura de -80°C e foram reativadas em 10 mL de caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Broth* - BHI - Oxoid®) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, foi realizada a semeadura por esgotamento em ágar sangue (Oxoid®), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado, e em ágar MacConkey (Oxoid®), e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia morfológicamente compatível de cada amostra foi transferida para 10 mL de caldo BHI e o material foi novamente incubado conforme as condições anteriormente citadas. Após, pipetou-se 115µL de caldo BHI nos cartões FTA (Whatman™ - GE Healthcare® - Cat. No. WB12 0206) e as amostras foram mantidas em fluxo laminar até completa secagem e absorção da solução pelo papel filtro. As amostras transportadas foram recepcionadas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) onde inicialmente realizou-se a extração de DNA dos cartões FTA, seguindo o protocolo estabelecido por Pulido-Landinez *et al.* (2012). Discos com 3 mm de diâmetro foram coletados dos cartões FTA utilizando-se o coletor de amostras FTA *Harris Uni-Core* (Whatman™ - GE Healthcare®) e como base o tapete para corte *Harris Cutting Mat* - GE Healthcare®). O procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar e para a obtenção dos discos, o coletor foi posicionado verticalmente e sua ponta pressionada firmemente contra a área a ser coletada enquanto eram realizados movimentos circulares com o coletor para o corte do cartão (Figura 1A). Os discos foram transferidos para microtubos contendo 200µL do reagente de purificação FTA (Whatman™ - GE Healthcare®). Após, duas lavagens, intercaladas por período de incubação de 5 minutos a 25°C foram realizadas. Em seguida, após descarte do reagente de purificação, foram adicionados 200µL do tampão TE (10mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) e mais duas lavagens, intercaladas por períodos de

incubação de 5 minutos a 25°C, também foram realizadas. O DNA extraído foi estocado para posterior quantificação e para a pesquisa dos genes associados à virulência.

Em conjunto, um disco com a mesma dimensão e correspondente a cada cepa foi coletado e transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo BHI para a incubação a 37°C por 24 horas para avaliar a segurança dos cartões FTA (Whatman<sup>TM</sup> - GE Healthcare<sup>®</sup> - Cat. No. WB12 0206) (Figura 1B). Posteriormente, os caldos foram semeados em ágar sangue (Oxoid<sup>®</sup>), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado, e em ágar *MacConkey* (Oxoid<sup>®</sup>), e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas. Caso houvesse o crescimento de colônias morfológicamente compatíveis com *P. multocida*, testes bioquímicos complementares a fim de se confirmar a espécie isolada foram realizados conforme metodologia descrita por Glisson, Sandhu e Hofacre (2008).



**Figura 1** -Coleta dos discos dos cartões FTA (A). Disco coletado em caldo BHI para avaliar a segurança dos cartões FTA (B).

A partir do DNA extraído, um protocolo de PCR espécie-específico estabelecido por Townsend *et al.* (1998) para amplificação de um fragmento de 460 pb do gene *kmt* foi empregado a fim de se avaliar a viabilidade do material presente no cartão. Após o PCR, o DNA foi quantificado utilizando-se o kit comercial *Quant-iTdsDNA HS Assay* (Invitrogen<sup>®</sup>), conforme metodologia recomendada pela fabricante. A leitura foi realizada no fluorímetro QUBIT (Invitrogen<sup>®</sup>). Para a detecção dos genes associados à virulência (*toxA*, *ptfA*, *pfhA*, *nanH*, *nanB*, *exbd-tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *sodA*, *sodC*, *hyaD-hyaC*, *dcbF*, *bcbD*, *oma87*) foram



utilizados protocolos de multiplex-PCR elaborados anteriormente no laboratório (FURIAN, 2013). A análise estatística descritiva foi empregada para o cálculo da frequência absoluta e relativa dos genes de virulência pesquisados e para a determinação da média e do desvio padrão da concentração de DNA. Os testes não paramétricos do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para análise da associação dos genes de virulência aos pares. O Teste de McNemar foi utilizado para determinar e comparar as frequências dos genes de virulência dentro dos grupos de igual função. O programa *Statistical Package for Social Sciences*<sup>®</sup> (SPSS) foi empregado, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.

## Resultados e Discussão

Em relação à segurança dos cartões FTA na inativação dos microrganismos, observou-se que 100% (27/27) dos discos coletados correspondentes a cada cepa não apresentaram turbidez do BHI ou crescimento no ágar sangue e no ágar *MacConkey*. A segurança do meio já havia sido reportada em alguns estudos que também avaliaram a inativação de vírus e de bactérias patogênicas para aves nos cartões de transporte (MOSCOSO *et al.*, 2005; PEROZO *et al.*, 2006; PULIDO-LANDÍNEZ *et al.*, 2012).

Em relação à viabilidade de emprego dos cartões FTA, 100% (27/27) das cepas no estudo foram confirmadas através de PCR a partir da amplificação de um fragmento de 460 pb do gene *kmt*. Da mesma forma, a concentração média de DNA foi de 54,54 ng/ $\mu$ L $\pm$ 30,03, com um valor mínimo observado de 13,40 ng/ $\mu$ L e máximo de 100 ng/ $\mu$ L. Concentrações semelhantes foram descritas por Pulido-Landínez *et al.* (2012) que utilizou cartões FTA para o transporte de *Salmonella spp.* isolada de produtos avícolas. Além disto, o DNA extraído foi viável para a posterior pesquisa dos genes associados à virulência.

O transporte de substâncias infecciosas para diagnóstico, pesquisa ou ensino deve ser feito em condições adequadas, respeitando diversas normas nacionais e internacionais (WHO, 2007; BRASIL, 2009). Os cartões FTA são uma alternativa para o transporte seguro de microrganismos inativados (SMITH; BURGOYNE, 2004; PEROZO *et al.*, 2006; CORTES *et al.*, 2009; PULIDO-LANDÍNEZ *et al.*, 2012) e têm sido empregados em estudos de vírus e bactérias patogênicas de interesse na área de sanidade avícola para posterior análises moleculares (MOSCOSO *et al.*, 2004; MOSCOSO *et al.*, 2005; MOSCOSO *et al.*, 2006; PEROZO *et al.*, 2006; CORTES *et al.*, 2009; LANDÍNEZ-PULIDO *et al.*, 2012; AWAD *et al.*, 2014).

A maioria dos genes de virulência pesquisados apresentou uma alta frequência e uma distribuição regular. Assim, não foi observada diferença significativa na ocorrência dos genes conforme a mesma função ou processo associado ( $p>0,05$ ). A exceção foi a detecção do gene *hyaD-hyaC*, específico ao sorogrupo A, em 100% (27/27) das cepas, em relação aos genes *dcbF* e *bcbD*, respectivamente específicos aos sorogrupos D e B da bactéria ( $p<0,05$ ). O tipo capsular A é predominante em casos de CA (CHUNG *et al.*, 2001) enquanto o sorogrupo B, o qual também está presente em aves, assim como o F, são considerados raros (GLISSON, 2008). As frequências absoluta e relativa dos 14 genes de virulência pesquisados estão descritas na Tabela 01.

Tabela 01 - Distribuição dos 14 genes de virulência nas cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de cólera aviária nos Estados Unidos detectados por multiplex-PCR.

Processo ou enzima	Gene	Frequências absoluta e relativa (%) - (n=27)
Proteínas de membrana externa	<i>oma87</i>	27 (100)
	<i>exbD-tonB</i>	27 (100)
Metabolismo do ferro	<i>hgbA</i>	27 (100)
	<i>hgbB</i>	26(96,3)
Sialidases	<i>nanH</i>	23 (85,2)
	<i>nanB</i>	27 (100)
Superóxido dismutases	<i>sodA</i>	25 (92,6)
	<i>sodC</i>	26 (96,3)
Toxina dermonecrótica	<i>toxA</i>	0 (0)
Adesinas	<i>ptfA</i>	27 (100)
	<i>pfhA</i>	22 (81,5)
Tipo capsular	<i>hyaD-hyaC</i>	27 (100)
	<i>dcbF</i>	0 (0)
	<i>bcbD</i>	0 (0)

O gene *oma87*, que codifica uma proteína de membrana externa (OMP) em *P. multocida* (HATFALUDI *et al.* 2010), foi encontrado em 100% (27/27) das cepas analisadas.

As OMPs são consideradas fatores imunogênicos conservados (KUBATZKY, 2012) e o resultado está de acordo com outros trabalhos em que este gene foi pesquisado (DAVIES *et al.*, 2004; EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009; FURIAN *et al.*, 2013).

Entre os genes envolvidos no metabolismo do ferro selecionados para o estudo, *exBD-tonB* e *hgbA* foram detectados em 100% (27/27) das cepas e *hgbB* em 96,3% (26/27) dos casos. As proteínas que fazem parte do complexo TonB são responsáveis pela energia necessária para internalizar o ferro no espaço periplasmático, independentemente do mecanismo de captação do elemento (KREWULAK *et al.*, 2008). A grande quantidade de genes descritos envolvidos no metabolismo do ferro sugere que a bactéria apresenta um número redundante de proteínas associadas para uma mesma função (BOYCE *et al.*, 2012). Exemplo são as proteínas HgbA e HgbB, ambas relacionadas com a captação de ferro a partir da hemoglobina (HATFALUDI *et al.*, 2010). Trabalhos anteriores apresentaram resultados semelhantes aos obtidos no estudo, na análise da ocorrência dos dois genes (EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009; FURIAN *et al.*, 2013).

A maioria dos genes que aumentam sua transcrição durante o processo infeccioso também estão envolvidos na aquisição de nutrientes e em processos metabólicos (BOYCE; ADLER, 2006). Cepas altamente virulentas de *P. multocida* frequentemente secretam enzimas hidrolíticas, como sialidases, que facilitam a aquisição de nutrientes e a disseminação no organismo (WILSON; HO, 2013). Como exemplo, NanH e NanB removem o ácido siálico das células hospedeiras para utilizá-lo como fonte de carbono (HARPER *et al.*, 2006). Os genes codificantes das duas enzimas foram detectados, respectivamente, em 100% (27/27) e 85,2%. (23/27) das cepas no trabalho. Ao contrário de *nanB*, a ocorrência do gene *nanH* foi variável em relação aos estudos de Ewers *et al.* (2006) e Furian *et al.* (2013), que o detectaram respectivamente em 65% e 96% das cepas em pesquisas desenvolvidas na Alemanha e no Brasil. Em relação aos genes que codificam enzimas com função antioxidante, *sodA* e *sodC* estiveram presentes em 92% e 96% das cepas, respectivamente. Estes resultados são similares ao trabalho de Furian *et al.* (2013).

O gene *toxA* não foi detectado em nenhuma das 27 cepas analisadas. Apesar de alguns trabalhos o detectarem em cepas do sorogrupo A oriundas de diferentes hospedeiros (ZAGLIC *et al.*, 2005; SHAYEGH; ATASHPAZ; HEJAZI, 2008; VOUGIDOU *et al.*, 2015), este gene que codifica a toxina dermonecrótica (PMT – *Pasteurella multocida* Toxin) está principalmente associado a cepas do sorogrupo D e a casos de rinite atrófica progressiva em suínos (BOYCE *et al.*, 2010).

Geralmente as bactérias patogênicas apresentam múltiplas adesinas e a presença destas na superfície bacteriana possui correlação com a virulência (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; KLINE *et al.*, 2009). O gene *ptfA*, que codifica uma subunidade da fímbria do tipo IV, apresenta alto grau de similaridade a outras fímbrias (DOUGHTY; RUFFOLO; ADLER, 2000; HATFALUDI *et al.*, 2010), foi detectado em 100% (27/27) das cepas analisadas. Outros trabalhos obtiveram resultados similares na pesquisa deste gene (EWERS *et al.*, 2006; FURIAN *et al.*, 2013). A fímbria do tipo IV é uma potencial candidata ao desenvolvimento de vacinas (SHIVACHANDRA *et al.*, 2012), pois a proteína PtfA está ancorada em *P. multocida* independentemente do sorogrupo e é expressa *in vitro* em condições de microaerofilia em um ambiente comparável com o trato respiratório superior do hospedeiro (EWERS *et al.*, 2006). Por outro lado, o gene *pfhA*, que codifica uma hemaglutinina filamentosa, foi observado em 81,5% (22/27) cepas avaliadas. Este gene apresenta frequência variável (EWERS *et al.*, 2006, FURIAN *et al.*, 2013) e está possivelmente relacionado com a maior patogenicidade das cepas em casos de pasteurelose (EWERS *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2014).

Não foi constatada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na ocorrência dos genes de virulência entre as 27 cepas isoladas de reprodutoras nos Estados Unidos e a frequência dos mesmos genes entre 56 isolados provenientes do sul do Brasil em estudo prévio realizado no laboratório (FURIAN *et al.*, 2015 – dados não publicados). A observação de padrões de distribuição gênica com pequenas variações está provavelmente associada com a aquisição dos genes de virulência através da evolução e através da transmissão horizontal dentro da população de *P. multocida* (TANG *et al.*, 2009).

## **Conclusões**

Os cartões FTA demonstraram ser uma ferramenta segura para o transporte de DNA de *P. multocida*, já que não houve o crescimento das cepas selecionadas ou de outros microrganismos. Da mesma forma, os cartões demonstraram ser viáveis para o emprego em análises moleculares, pois houve a conservação e extração do DNA em quantidade necessária para a pesquisa dos genes através da técnica de multiplex-PCR.

A maioria dos genes de virulência pesquisados apresentou uma alta frequência, compatível com outros estudos realizados. Além disto, não houve uma diferença significativa na ocorrência dos genes selecionados entre as cepas de *P. multocida* isoladas nos Estados Unidos e no sul do Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ATASHPAZ, S. SHAYEGH, J.; HEJAZI, M. S. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 355-357, 2009.
- AWAD, F. *et al.* Evaluation of Flinders Technology Associates cards for storage and molecular detection of avian metapneumoviruses. **Avian Pathology**, v.43, n.2, p. 125-129, fev. 2014.
- BETHE, A.; WIELER, L. H.; SELBITZ, H. J.; EWERS, C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 97-105, 2009.
- BOYCE, J. D.; ADLER, B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 117-122, 2006.
- BOYCE, J. D. *et al.* *Pasteurella*. In: In: GLYES, C. L. *et al.* (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 325-346.
- BOYCE, J.D.; *et al.* Pathogenomics of *Pasteurella multocida*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 23-38, 2012.
- BRASIL, 2009. Ministério da Saúde. Portaria n. 472 de 09 de março de 2009. Regulamento técnico MERCOSUL para transporte de substâncias infecciosas e amostras biológicas entre os estados partes do MERCOSUL. **Diário Oficial da União**. Seção 1, p. 31-32. Edição de 10/03/09.
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Fowl cholera. **Revue Scientifique et Technique del Office International des Epizooties**, v. 19, p. 626-637, 2000.
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. The genus *Pasteurella*. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3 ed. New York: Springer, 2006. p.1062-1090.
- CHUNG, J. Y.; ZHANG, Y.; ADLER, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, p. 289-296, 1998.
- CHUNG, J. Y. *et al.* Role of capsule in the pathogenesis of Fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. **American Society for Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 2487-2492, 2001.
- 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, p. 376-380, 2007.
- CORTES, A.; MONTIEL, E.; GIMENO, I. Validation of Marek's Diseases diagnostic and monitoring of Marek's Disease vaccines from samples collected in FTA cards. **Avian Diseases**, v. 53, n. 4, p. 510-516, 2009.

COX, A. J. *et al.* Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, p. 287-296, 2003.

DAVIES, R. L.; MacCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 145-158, 2004.

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

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

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

FURIAN, T. Q. **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FURIAN, T.Q. *et al.* Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.177-182, 2013.

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.

GUENTHER, S. *et al.* Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 75-80, 2008.

GUO, D.C. *et al.* Construction and virulence of filamentous hemagglutinin protein B1 mutant of *Pasteurella multocida* in chickens. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 10, p. 2268-2275, oct. 2014.

HARPER, M.; BOYCE, J. D.& ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS MicrobiolLett**, v.265, p. 1-10, sep. 2006.

HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. **Currents Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 39-51, 2012.

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

KLINE, K. A. *et al.* Bacterial adhesins in host-microbe interaction. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, june 2009.

KRAUSS, R. H. S. *et al.* Avian influenza surveillance: on the usability of FTA<sup>®</sup> cards to solve biosafety and transport issues. **Wildfowl and Wetlands Trust**, v. 2, p. 215-223, 2009.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1781-1804, 2008.

KUBATZKY, K. F. *Pasteurella multocida* and Immune Cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 23-38, 2012.

LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L. Pasteureloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R.L. (Ed.). **Saúde Aviária e Doenças**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 123-126.

MADIGAN, M. T. *et al.* Princípios de Genética Bacteriana. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 278-309.

MAY, B. J. *et al.* Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm 70. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n.6, p. 3460-3465, 2001.

MIZAN, S. *et al.* Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialic lactose specificity from *Pasteurella multocida*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, 2000. p. 6874-6883.

MOSCOSO, H. *et al.* Inactivation, storage and PCR detection of *Mycoplasma* on FTA-Filter Paper. **Avian Diseases**, v. 48, n. 4, p. 841-850, 2004.

MOSCOSO, H. *et al.* Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. **Avian Diseases**, v. 49, n. 1, p. 24-29, 2005.

MOSCOSO, H.; ALVARADO, I.; HOFACRE, C. Molecular analysis of infectious Bursal Disease Virus from bursal tissues collected on FTA-Filter Paper. **Avian Diseases**, v. 50, n. 3, p. 391-396, 2006.

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.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 503-530.

PARTE, A.C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 613-616, jan. 2014.

PEROZO, F. *et al.* Use of FTA<sup>®</sup> filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. **Avian Pathology**, v. 35, p. 93-98, 2006.

PULIDO-LANDÍMEZ, M. *et al.* Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 1-7, 2012.

RAJKHOWA, S. Development of a novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* from pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n.3, p. 293-298, sept. 2015.

SAMUEL, M.D.; BOTZLER, R.G.; WOBESER, G.A. Avian Cholera. In: THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. (Ed.). **Infectious Diseases of Wild Diseases of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 239-269.

SHAYEGH, J.; ATASHPAZ, S.; HEJAZI, M. S. Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 3, n. 4, p. 206-213, 2008.

SHAYEGH, J. *et al.* Pheno-and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, p. 3707-3710, 2009.

SHIVACHANDRA, S.B. *et al.* Expression and purification of recombinant type IV fimbrial subunit protein of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 in Escherichia coli. **Research In Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1128-31, dec. 2012.

SMITH. L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA data basing paper. **BMC Ecology**, v. 4, p. 4-9, 2004.

TANG, X. *et al.* Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 951-958, apr. 2009.

TOWNSEND, K. M. *et al.* Development of PCR assays of species-and type-identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 1096-1100, 1998.

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

VOUDIGOU, C. *et al.* Distribution of the ompA-types among ruminant and swine pneumonic strains of *Pasteurella multocida* exhibiting various cap-locus and toxA patterns, **Microbiological Research**, v. 174, p. 1-8, may 2015.

WILKIE, I.W.; HARPER, M.; ADLER, B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 1-22, 2012.

WILSON, B. A.; HO, M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. **Journals ASMorg**, v. 26, n. 3, p. 631-655, jul. 2013.

WHO - World Health Organization. 2007. **Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2007- 2008**. Geneva. (WHO/CDS/EPR/2007.2). p. 23-25.

ZAGLIC, Z. *et al.* Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* isolated from different species in the Czech Republic: capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotxin production. **Veterinární Medicína**, v. 8, p. 345-354, 2005.



### 3 CONCLUSÕES

O transporte de agentes infecciosos deve seguir normas nacionais e internacionais, muitas vezes complexas que podem dificultar a chegada do material no laboratório. Os cartões FTA demonstraram ser uma ferramenta efetiva e segura para o transporte de DNA de *P. multocida*. Uma vez que nenhuma das amostras analisadas apresentou crescimento de microrganismos, demonstrando eficiência na inativação da bactéria. Da mesma forma, os cartões conservaram o DNA em condições ideais para análises posteriores.

Em relação à pesquisa dos genes associados à virulência, poucos estudos são realizados para a detecção desses genes e classificação das cepas em perfis genéticos, que podem contribuir para o posterior estudo da patogenia da CA, associando um grupo específico de genes ao grau de severidade da doença. A maioria dos genes pesquisados apresentou uma alta frequência, o que é compatível com outros estudos e com isolados obtidos de casos clínicos de CA.

## REFERÊNCIAS

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual – 2014**. São Paulo. ABPA, 2015.

ANDREATTI FILHO, R. L. Coriza infecciosa das galinhas. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Ed.). **Saúde Aviária e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 118-121.

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

AVEWORLD. Sumário Executivo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aveworld**, n. 73, p. 82-86, abr./maio. 2015.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Anuário 2015 da Avicultura Industrial. **Avicultura Industrial**, n. 11, nov. 2014.

AWAD, F. *et al.* Evaluation of Flinders Technology Associates cards for storage and molecular detection of avian metapneumoviruses. **Avian Pathology**, v.43, n.2, p. 125-129, fev. 2014.

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

BOYCE, J. D.; ADLER, B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 117-122, 2006.

BOYCE, J. D. *et al.* *Pasteurella*. In: In: GLYES, C. L. *et al.* (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 325-346.

BOYCE, J.D. *et al.* Pathogenomics of *Pasteurella multocida*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 23-38, 2012.

BRASIL, 2009. Ministério da Saúde. Portaria n. 472 de 09 de março de 2009. Regulamento técnico MERCOSUL para transporte de substâncias infecciosas e amostras biológicas entre os estados partes do MERCOSUL. **Diário Oficial da União**. Seção 1, p. 31-32. Edição de 10/03/09.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Fowl cholera. **Revue Scientifique et Technique del Office International des Epizooties**, v. 19, p. 626-637, 2000.

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

CHUNG, J. Y.; ZHANG, Y.; ADLER, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, p. 289-296, 1998.

- CHUNG, J. Y. *et al.* Role of capsule in the pathogenesis of Fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. **American Society for Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 2487-2492, 2001.
- 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, p. 376-380, 2007.
- CORTES, A.; MONTIEL, E.; GIMENO, I. Validation of Marek's Diseases diagnostic and monitoring of Marek's Disease vaccines from samples collected in FTA cards. **Avian Diseases**, v. 53, n. 4, p. 510-516, 2009.
- COX, A. J. *et al.* Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, p. 287-296, 2003.
- DAVIES, R. L.; MacCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 145-158, 2004.
- DOUGHTY, S. W.; RUFFOLO, C. G.; ADLER, B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 79-90, 2000.
- DZIVA, F. *et al.* Diagnostic and typing options for investigating disease associated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 1-22, 2008.
- EWERS, C. *et al.* Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.304-317, 2006.
- FURIAN, T. Q. **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- FURIAN, T.Q. *et al.* Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.177-182, 2013.
- 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.
- GUENTHER, S. *et al.* Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 75-80, 2008.
- GUO, D.C. *et al.* Construction and virulence of filamentous hemagglutinin protein B1 mutant of *Pasteurella multocida* in chickens. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, n. 10, p. 2268-2275, oct. 2014.
- HARPER, M.; BOYCE, J. D.& ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS MicrobiolLett**, v.265, p. 1-10, sep. 2006.

- HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. **Currents Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 39-51, 2012.
- HATFALUDI, T. *et al.* Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 1-17, 2010.
- KLINE, K.A. *et al.* Bacterial adhesins in host-microbe interaction. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, June 2009.
- KRAUSS, R. H. S. *et al.* Avian influenza surveillance: on the usability of FTA<sup>®</sup> cards to solve biosafety and transport issues. **Wildfowl and Wetlands Trust**, v. 2, p. 215-223, 2009.
- KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1781-1804, 2008.
- KUBATZKY, K.F. *Pasteurella multocida* and Immune Cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 23-38, 2012.
- LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. L. Pasteureloses aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R.L. (Ed.). **Saúde Aviária e Doenças**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007. p.123-126.
- MADIGAN, M. T. *et al.* Princípios de Genética Bacteriana. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 278-309.
- MAY, B. J. *et al.* Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm 70. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n.6, p. 3460-3465, 2001.
- MIZAN, S. *et al.* Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialic lactose specificity from *Pasteurella multocida*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, 2000. p. 6874-6883.
- MOSCOSO, H. *et al.* Inactivation, storage and PCR detection of *Mycoplasma* on FTA-Filter Paper. **Avian Diseases**, v. 48, n. 4, p. 841-850, 2004.
- MOSCOSO, H. *et al.* Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. **Avian Diseases**, v. 49, n. 1, p. 24-29, 2005.
- MOSCOSO, H.; ALVARADO, I.; HOFACRE, C. Molecular analysis of infectious Bursal Disease Virus from bursal tissues collected on FTA-Filter Paper. **Avian Diseases**, v. 50, n. 3, p. 391-396, 2006.
- 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.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 503-530.
- PARTE, A.C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 613-616, Jan. 2014.

PEROZO, F. *et al.* Use of FTA<sup>®</sup> filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. **Avian Pathology**, v. 35, p. 93-98, 2006.

PULIDO-LANDÍMEZ, M. *et al.* Uso dos cartões FTA para o transporte de amostras de DNA de *Salmonella* spp. isoladas de produtos avícolas do Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 1-7, 2012.

RAJKHOWA, S. Development of a novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* from pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n.3, p. 293-298, sept. 2015.

SAMUEL, M.D.; BOTZLER, R.G.; WOBESER, G.A. Avian Cholera. In: THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B. (Ed.). **Infectious Diseases of Wild Diseases of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 239-269.

SHAYEGH, J.; ATASHPAZ, S.; HEJAZI, M. S. Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurellamultocida*. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 3, n. 4, p. 206-213, 2008.

SHAYEGH, J. *et al.* Pheno-and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, p. 3707-3710, 2009.

SHIVACHANDRA, S.B. *et al.* Expression and purification of recombinant type IV fimbrial subunit protein of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 in Escherichia coli. **Research In Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1128-31, dec. 2012.

SMITH. L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA data basing paper. **BMC Ecology**, v. 4, p. 4-9, 2004.

TANG, X. *et al.* Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 951-958, apr. 2009.

TOWNSEND, K. M. *et al.* Development of PCR assays of species-and type-identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 1096-1100, 1998.

UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual – 2013**. São Paulo. UBABEF, 2014.

UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual – 2014**. São Paulo. UBABEF, 2015.

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

VOUDIGOU, C. *et al.* Distribution of the ompA-types among ruminant and swine pneumonic strains of *Pasteurella multocida* exhibiting various cap-locus and toxA patterns, **Microbiological Research**, v. 174, p. 1-8, may 2015.

WILKIE, I.W.; HARPER, M.; ADLER, B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 1-22, 2012.

WILSON, B. A.; HO, M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. **Journals ASMorg**, v. 26, n. 3, p. 631-655, jul. 2013.

WHO - World Health Organization. 2007. **Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2007- 2008**. Geneva. (WHO/CDS/EPR/2007.2). p. 23-25.

ZAGLIC, Z. *et al.* Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* isolated from different species in the Czech Republic: capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotxin production. **Veterinární Medicína**, v. 8, p. 345-354, 2005.