

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E  
HIGIENE DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR DIFERENTES CEPAS DE *Pasteurella*  
*multocida* SOBRE SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO**

BRUNNA DIAS DE EMERY

**PORTO ALEGRE  
2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO, TECNOLOGIA E  
HIGIENE DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR DIFERENTES CEPAS DE *Pasteurella*  
*multocida* SOBRE SUPERFÍCIE DE POLIESTIRENO**

Autor: Brunna Dias de Emery

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Produção, Tecnologia e Higiene de Alimentos de Origem Animal.

Orientador: Dr. Thales Quedi Furian

**PORTO ALEGRE**  
**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por mais esta conquista em minha vida.  
ALHAMDULILAH.

Agradeço a minha família, especialmente aos meus pais Ricardo e Eliene por todo o incentivo e amor incondicional e ao meu esposo Irfan, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador e colega, Thales Quedi Furian por toda a atenção prestada a este trabalho.

Ao meu querido Professor e amigo, Guiomar Pedro Bergmann pela amizade, paciência e consideração.

A todos os colegas do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), em especial a amiga Gabriela Zottis por toda a ajuda prestada.

## RESUMO

A bactéria *Pasteurella multocida* ocasiona inúmeras perdas econômicas associadas a doenças respiratórias e, em alguns casos, ao processamento de produtos de origem animal. A cólera aviária (CA) está entre as principais doenças causadas por este microrganismo. Entre os diversos mecanismos de virulência existentes, a formação de biofilmes demonstra ser um importante fator para a proteção e para a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis. Estudos sobre a capacidade de formação de biofilmes de *P. multocida* não são frequentes quando comparados com aqueles envolvendo outros microrganismos. Da mesma forma, a formação de biofilme geralmente não é relacionada com a patogenicidade dos isolados. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de isolados de *P. multocida* e a sua relação com a patogenicidade das cepas, além da ocorrência de genes do locus *tad*. Os resultados sobre a capacidade de aderência demonstraram que a maioria dos exemplares analisados (52,12%) foram classificados como fracamente aderente e mais de 40% (40,42%) não produziram biofilme. Na análise por PCR para a detecção de genes do locus *tad*, observou-se que 56,52% das 94 cepas analisadas foram positivas para os quatro genes selecionados (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*). Após o agrupamento das amostras as cepas foram relacionadas com os seus respectivos IPs, anteriormente obtidos em estudo *in vivo*. O IP médio das cepas classificadas como não produtoras de biofilme apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao IP das cepas moderadamente produtoras. Da mesma forma, os exemplares classificados como fracamente produtores de biofilme diferiram significativamente do grupo de cepas moderadamente produtoras. Entretanto, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) do IP dos exemplares não produtores de biofilme e dos fracamente produtores. Concluiu-se com este trabalho que cepas de *P. multocida* isoladas de casos de CA e de pulmões de suínos possuem capacidade de adesão em superfície de poliestireno, geralmente apresentando níveis baixos de aderência. Os genes *tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*, foram detectados em conjunto na maioria das cepas analisadas e não houve associação significativa entre a presença dos mesmos e a origem de isolamento. Da mesma forma, não houve associação entre a presença dos genes *tadB* e *tadD* com a capacidade de formação de biofilme das cepas. Em geral, cepas de menor patogenicidade apresentaram uma maior capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno.

Palavras-chave: Biofilme, *Pasteurella multocida*, patogenicidade.

## **ABSTRACT**

*Pasteurella multocida* bacteria causes numerous economic losses associated with respiratory diseases, and in some cases, to the processing of animal products. Fowl Cholera (FC) is among the main diseases caused by this microorganism. Among the various existing virulence mechanisms, the formation of biofilms proves to be an important factor for the protection and for bacterial survival in hostile environments. Studies on biofilm formation capacity by *P. multocida* are infrequent when compared to those involving other microorganisms. Moreover, biofilm formation is not generally related to the pathogenicity of isolates. For this reason, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* biofilm formation capacity of *P. multocida* isolates and their relationship with the pathogenicity of strains, besides the occurrence of genes *tad* locus. The results of the adherence capacity showed that most of the analyzed samples (52.12%) were classified as weakly adherent and more than 40% (40.42%) did not produce biofilm. In PCR analysis for detection of gene *tad* locus, it was found that 56.52% of the 94 strains analyzed were positive for the four selected genes (*tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG*). After grouping the samples, the strains were related to their respective IPs, previously obtained in an *in vivo* study. The average IP of the strains classified as non-biofilm producers show statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) compared to the IP of moderately producing strains. Similarly, classified samples as weakly biofilm producers differ significantly from the group of moderately producing strains. However, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) of the IP of the non-producing samples of biofilm and of the weakly producers. It was concluded from this work that *P. multocida* strains which were isolated from CA and pig lungs have the ability of adhesion in polystyrene surface, usually presenting a low level of adhesion. The *tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG* genes, were detected along with in most of the analyzed strains and there was no significant association between the presence of these genes and their isolation of origin. Similarly, there was no association between the presence of *tadB* and *tadD* genes with biofilm-forming ability of the strains. In general, less pathogenic strains showed a higher capacity biofilm formation in polystyrene plates.

*Key-words: Biofilm, Pasteurella multocida, pathogenicity.*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados.....	18
------------	--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Frequência relativa (%) das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> classificadas como não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras e fortemente produtoras de biofilme conforme a origem de isolamento.....	17
GRÁFICO 2 -	Frequência relativa (%) das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> classificadas como não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras e fortemente produtoras de biofilme conforme a origem de isolamento.....	19
GRÁFICO 3 -	Distribuição das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária e suína conforme a formação de biofilme e os índices de patogenicidade (IP) calculados a partir da inoculação experimental de pintos.....	20

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequência de oligonucleotídeos dos genes <i>tad</i> e seus respectivos tamanhos de amplicons.....	15
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
2.1 Amostras de <i>Pasteurella multocida</i> .....	13
2.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme a 37°C .....	13
2.3 Índice de patogenicidade das cepas .....	14
2.4 Extração de DNA e pesquisa de genes do locus <i>tad</i> .....	14
2.5 Análise estatística .....	16
<b>3. RESULTADOS</b> .....	17
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola tem como base um sistema complexo e dinâmico, em que as ações conjuntas nas áreas de manejo, nutrição, genética e de sanidade projetaram o Brasil como o terceiro maior produtor de frangos do mundo, juntamente com Estados Unidos e China. Além disso, o país mantém-se como o maior exportador do setor, ofertando um volume significativo de proteína de origem animal em curto prazo e com baixo custo de produção (AMARAL, 2014).

No 1º trimestre de 2015 foram abatidas no Brasil 1,380 bilhão frangos de corte. Este resultado significou uma queda de 1,9% em relação ao trimestre imediatamente anterior e um aumento de 2,1% na comparação com o mesmo período de 2014. A Região Sul foi responsável por 59,2% do abate nacional de frangos no 1º trimestre de 2015, seguida pelas Regiões Sudeste (20,5%), Centro Oeste (15,1%), Nordeste (3,7%) e Norte (1,5%) (IBGE 2015).

Além do elevado consumo de carne de aves, que chegou a 41,80 kg por habitante no ano de 2014 (UBABEF, 2014), a avicultura nacional é uma forte geradora de empregos diretos e indiretos, além de representar uma fonte de renda para milhares de famílias de produtores integrados no Rio Grande do Sul (ZANATTA, 2008).

Nesta posição de destaque, a produção avícola possui atualmente um importante papel sócio econômico, o que faz necessário uma atenção mais detalhada no que diz respeito à saúde dos planteis. O crescimento econômico das indústrias está inteiramente relacionado com o aumento de tamanho dos sistemas de produção, bem como com o aumento da densidade animal em uma determinada área geográfica. Esta situação geralmente promove condições favoráveis para a multiplicação, disseminação e para a perpetuação de diversos patógenos, especialmente se as medidas de biosseguridade forem negligenciadas (SESTI, 2004).

Entre os patógenos capazes de causarem doenças em diferentes espécies animais, destaca-se a bactéria *Pasteurella multocida*, um bacilo Gram negativo que ocasiona inúmeras perdas econômicas associadas a doenças respiratórias (MORAES, 2014) e, em alguns casos, ao processamento de produtos de origem animal (Ribeiro et al. 2012). A cólera aviária (CA) está entre as principais doenças causadas por *P. multocida*, além da rinite atrófica progressiva em suínos, a septicemia hemorrágica em bovinos e a pasteurelose em coelhos (Ferreira et al. 2012, Wilkie et al. 2012). Casos esporádicos de infecções no homem também podem ocorrer

e são geralmente associados a arranhaduras e mordidas causadas por cães e gatos (Gerardo et al. 2001, Kawashima et al., 2010). Estas infecções podem variar de crônicas a septicêmicas e fatais, como geralmente é observado nos casos de CA e de septicemia hemorrágica (Wilkie et al. 2012).

Entre os diversos mecanismos de virulência existentes, a formação de biofilmes demonstra ser um importante fator para a proteção e para a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis, tais como em tecidos ou sobre uma superfície inerte, onde estão expostos à luz, dessecação, pressão osmótica e a variações de pH e de temperatura (Costerton et al. 1995, Sutherland 1997, Costerton et al. 1999). O biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas incluídas em uma matriz polimérica extracelular auto produzida, a qual está anexada a uma superfície biótica ou abiótica (Hall-Stoodley & Stoodley 2009). Infecções que envolvem microrganismos que apresentam este modo de crescimento são geralmente crônicas e de difícil tratamento (Costerton et al. 1999). A capacidade do agente de iludir o sistema imunológico nestas condições, bem como de resistir a elevadas concentrações antimicrobianas, facilitam a persistência do microrganismo no hospedeiro (Lemon et al. 2008, Silva et al. 2014).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos estima que 75% das infecções em seres humanos são causadas pela formação e persistência de biofilmes (Richards & Melander 2009). Considerando a extensa participação destas comunidades microbiológicas em infecções humanas, é provável que os biofilmes também estejam relacionados a uma variedade de infecções causadas em animais (Clutterbuck et al. 2007, Cochrane et al. 2009). Atualmente, as principais bactérias com potencial para a formação de biofilme incluem representantes dos gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Salmonella*, além de *Escherichia coli* (Cochrane et al. 2009, Rajagopal et al. 2013). Estudos recentes sugerem que *P. multocida* também pode formar biofilmes, inclusive em pulmões de suínos (Ross 2006, Rajagopal et al. 2013, Moraes et al. 2014). Entretanto, tais estudos não são frequentes quando comparados com aqueles envolvendo outros microrganismos. Da mesma forma, a formação de biofilme geralmente não é relacionada com a patogenicidade dos isolados.

As principais estruturas associadas à virulência e identificadas em cepas de *P. multocida* são a cápsula e o lipopolissacarídeo (LPS). Contudo, outros genes são definidos como importantes marcadores de virulência em *P. multocida* (Wilkie et al. 2012). Estes incluem genes que codificam proteínas de membrana externa (*ompH*, *oma87*), genes relacionados ao metabolismo do ferro (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*) e aqueles que codificam fímbrias e adesinas (*ptfA*, *pfhA*, *tad*) (Ewers et al. 2006, Corney et al. 2007, Hatfaludi et al.

2010). Os genes do *locus tad* já foram descritos como marcadores de adesão. Regiões homólogas do *locus* de biossíntese do gene desempenham um importante papel na formação de biofilmes, na colonização e na patogênese de outros membros da Família *Pasteurellaceae* e de algumas bactérias Gram-negativas (Tomich et al 2007, Moraes et al. 2014).

Como a bactéria *P. multocida* consiste em um importante patógeno envolvido em infecções respiratórias, estudos relacionados à formação de biofilmes tornam-se necessários. O biofilme pode constituir-se em um dos fatores de virulência para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Rajagopal et al. 2013). Por esta razão, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de isolados de *P. multocida* e a sua relação com a patogenicidade das cepas, além da ocorrência de genes do *locus tad*.

## 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Amostras de *Pasteurella multocida*

Um total de 94 cepas isoladas de casos clínicos de CA e de pulmões de suínos ao abate foi selecionado para o estudo. Todas as amostras encontravam-se estocadas em sangue total de ovino a uma temperatura de -80°C. A reativação e os testes preliminares de confirmação das amostras puras de *P. multocida* foram realizados conforme descrito por Glisson et al. (2008) e Furian et al. (2013).

As cepas foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* – BHI – Oxoid<sup>®</sup>) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, as amostras foram semeadas por esgotamento em ágar sangue (Oxoid<sup>®</sup>), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado, e em ágar MacConkey (Oxoid<sup>®</sup>), meio de cultura em que não há crescimento de *P. multocida*. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as colônias presentes no ágar sangue foram avaliadas de acordo com a sua morfologia. A coloração com Giemsa foi utilizada a fim de se observar a característica bipolar da célula bacteriana. Por último, realizaram-se os testes de catalase e de oxidase.

### 1.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme a 37°C

A metodologia utilizada foi adaptada a partir dos trabalhos desenvolvidos por Stepanovic et al. (2000), Silva et al. (2014) e Borges (2015). O teste foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 orifícios de fundo chato e as amostras foram classificadas de acordo com a produção de biofilme em quatro grupos: não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras ou fortemente produtoras. Uma cepa de *Salmonella enteritidis* e uma de *E. coli* anteriormente classificadas como fortemente produtoras de biofilmes e pertencentes à bacterioteca do CDPA foram selecionadas como controles positivos. O controle negativo do teste correspondeu ao caldo TSB sem glicose (*Trypticase Soy Broth* – TSB – Difco<sup>®</sup>) não inoculado que foi adicionado a três orifícios de cada placa.

Inicialmente, as amostras foram plaqueadas em ágar TSA sem glicose (*Trypticase Soy Agar* – TSA – Merck<sup>®</sup>) e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, uma colônia de cada amostra foi inoculada em caldo TSB sem glicose e incubada novamente a 37°C por 24 horas. Após este período, o cultivo foi diluído em caldo TSB a fim de se atingir a concentração correspondente à escala 1 de McFarland (Probac<sup>®</sup>), a qual indica uma

concentração de aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida, 200  $\mu$ L da suspensão bacteriana de cada amostra foram inoculadas em triplicata em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (KASVI<sup>®</sup>), incluindo-se as amostras selecionadas como controles positivos. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após incubação, a suspensão bacteriana foi removida e as placas foram lavadas três vezes com 250  $\mu$ L de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para a remoção das células planctônicas. Posteriormente, 200  $\mu$ L de metanol (Synth<sup>®</sup>) foram adicionados para a fixação das células bacterianas aderidas e o conteúdo foi removido depois de 15 minutos. As placas foram secas à temperatura ambiente e adicionaram-se 200  $\mu$ L de solução de cristal violeta de Hucker 2% para a coloração das células. Após 5 minutos, as placas foram lavadas em água corrente e secas novamente à temperatura ambiente. Para a realização da leitura, 200  $\mu$ L de ácido acético glacial (Synth<sup>®</sup>) a 33% foram adicionados e a leitura da absorbância foi realizada após uma hora a 550 nm em um leitor de ELISA (Biotek<sup>®</sup>). O valor da absorbância de cada amostra ( $DO_a$ ) foi obtido pela obtenção da média aritmética dos valores dos 3 orifícios. O ponto de corte foi definido como três desvios acima da média da absorbância do controle negativo ( $DO_c$ ). Para determinar a capacidade de formação de biofilme, a seguinte classificação foi utilizada: não aderente ( $DO_a \leq DO_c$ ), fracamente aderente ( $DO_c < DO_a \leq 2 \times DO_c$ ), moderadamente aderente ( $2 \times DO_c < DO_a \leq 4 \times DO_c$ ) e fortemente aderente ( $4 \times DO_c < DO_a$ ).

### 1.3 Índice de patogenicidade das cepas

Os índices de patogenicidade (IP) das 94 cepas foram associados com a capacidade de formação de biofilme a 37°C. Os IPs foram previamente calculados em uma escala de 0 a 10 a partir da inoculação experimental de pintos desenvolvida por Pilatti et al. (2016). Neste estudo prévio, as cepas foram divididas em três grupos de patogenicidade. O grupo de alta patogenicidade apresenta índices variando entre 8 a 10, o de média entre 4 e 7 e o grupo de baixa patogenicidade entre 0 a 3 (Pilatti et al. 2016).

### 1.4 Extração de DNA e pesquisa de genes do locus *tad*

Uma alíquota de 1 mL de BHI *overnight* de cada amostra foi separada para extração do DNA, utilizando-se o kit comercial de extração NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue (Macherey Nagel<sup>®</sup>). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da análise por PCR para detecção de quatro genes do locus *tad* (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*). Os oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa

dos genes *tadB*, *tadE* e *tadG* e para a pesquisa do *tadD* foram descritos por Moraes et al. (2014) e por Tang et al. (2009), respectivamente (Tabela1).

Tabela 1 - Sequência de oligonucleotídeos dos genes *tad* e seus respectivos tamanhos de amplicons.

Gene	Sequência dos primers (5' - 3')	Amplicon	Referência
<i>tadB</i>	TTCGCCTAATTGTCCCGTTA TGGAAGTTAGGGCAATACCG	150 pb	Moraes et al. (2014)
<i>tadD</i>	TCTACCCATTCTCAGCAAGGC ATCATTTCTGGGCATTACCC	416 pb	Tang et al. (2009)
<i>tadE</i>	TGGATTCGTCCCAAGAGAAC ATCTCTCCTACGGGGAGTCG	195 pb	Moraes et al. (2014)
<i>tadG</i>	AACTTGCCCAATTGTTCTCG CCTTCTGGTTGGACTTCTGC	224 pb	Moraes et al. (2014)

Para a amplificação do gene *tadD*, o protocolo de PCR anteriormente adaptado por Furian et al. (2016) no laboratório foi empregado. A amplificação dos genes *tadB*, *tadE* e *tadG* foi realizada conforme o protocolo descrito por Moraes et al. (2014) com modificações. Neste caso, o mix de reagentes da reação foi composto por 2,5 µL de Tampão 10x, 0,4 µL de dNTPs (10 mM - LudwigBiotec<sup>®</sup>), 0,5 µL de primers (20 pmol - Invitrogen<sup>®</sup>), 1,5 U da enzima GoTaq<sup>®</sup> Hot Start Polymerase (Promega<sup>®</sup>), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM - Promega<sup>®</sup>) e 17,55 µL de água ultra pura. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Swift MaxPro Thermal Cycler - ESCO Technologies<sup>®</sup>) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C (30 segundos), anelamento a 54°C (30 segundos) e de extensão a 72°C (60 segundos), além da extensão final a 72°C (10 minutos). A eletroforese dos produtos amplificados foi desenvolvida em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo e os géis foram fotodocumentados (AlphaDigDoc Pro - Alpha Innotech<sup>®</sup>) e posteriormente interpretados. As cepas padrão de *P. multocida* ATCC 12945 e de *Avibacterium gallinarum* ATCC 13360 foram selecionadas como controle positivo e negativo dos testes, respectivamente.

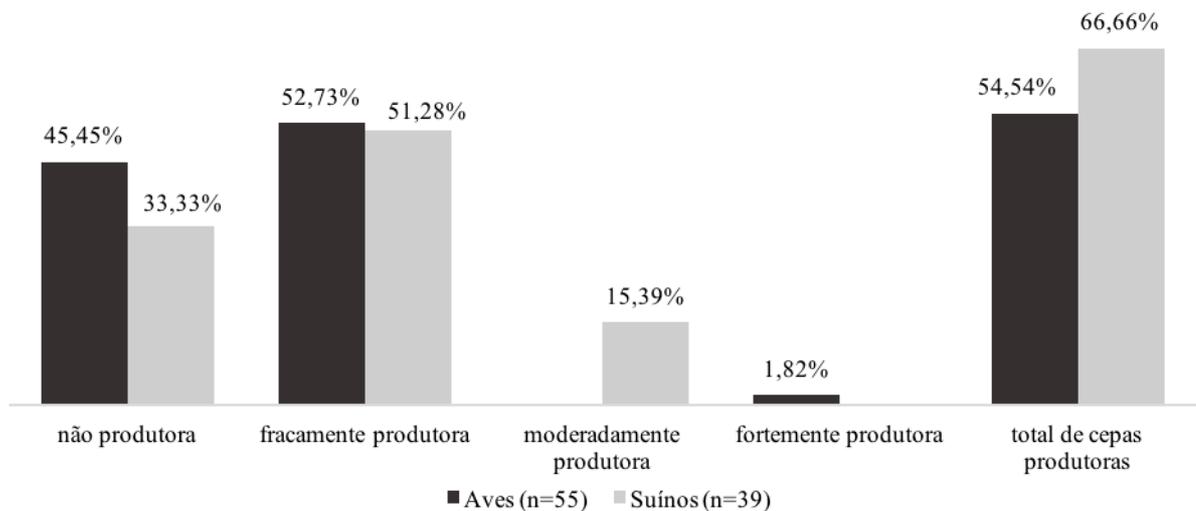
### 1.5 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi empregada para a determinação da frequência absoluta e relativa dos genes de virulência, assim como para o agrupamento das amostras quanto à capacidade de formação de biofilme. Os testes não paramétricos do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Exato de Fisher foram utilizados para análise da distribuição das cepas classificadas em cada grupo do biofilme. Os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney foram utilizados para a comparação das médias dos índices de patogenicidade das cepas com a capacidade de formação de biofilme. O programa *Statistical Package for Social Sciences*<sup>®</sup> (SPSS) foi utilizado para as análises estatísticas, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.

## 2. RESULTADOS

As cepas de *P. multocida* de ambas as origens de isolamento foram capazes de formar biofilme em placas de poliestireno, conforme demonstram os resultados apresentados no Gráfico 1. Contudo, a maioria dos exemplares (52,12%) foi classificada como fracamente aderente e mais de 40% das cepas de *P. multocida* (40,42%) não produziram biofilme. Apesar do maior número de exemplares aviários classificados como forte ou moderadamente produtores (Gráfico 1), não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na frequência de cepas não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras e fortemente produtoras entre as duas origens de isolamento.

Gráfico 1 - Frequência relativa (%) das cepas de *Pasteurella multocida* classificadas como não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras e fortemente produtoras de biofilme conforme a origem de isolamento.



Na análise por PCR para a detecção de genes do *locus tad*, observou-se que 56,52% das 94 cepas de *P. multocida* analisadas foram positivas para os quatro genes selecionados (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*). Da mesma forma, todos os protocolos de PCR foram específicos aos genes pesquisados (Fig.1).

Considerando-se a frequência dos genes conforme a origem de isolamento (Gráfico 2), constatou-se que mais de 80% das cepas de origem aviária e suína foram positivas para *tadB* e que os genes *tadE* e *tadG* foram detectados em 100% dos exemplares, independentemente da

origem. Por outro lado, o gene *tadD* foi detectado em 50% das cepas aviárias e em 83,33%, das cepas isoladas de suínos (Gráfico 2).

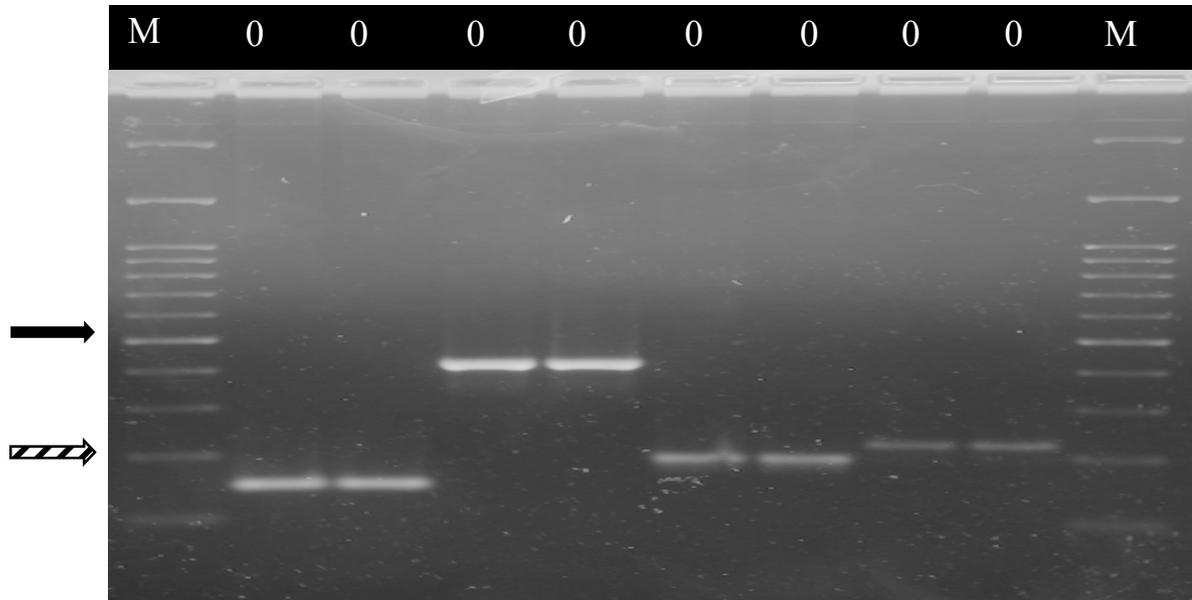
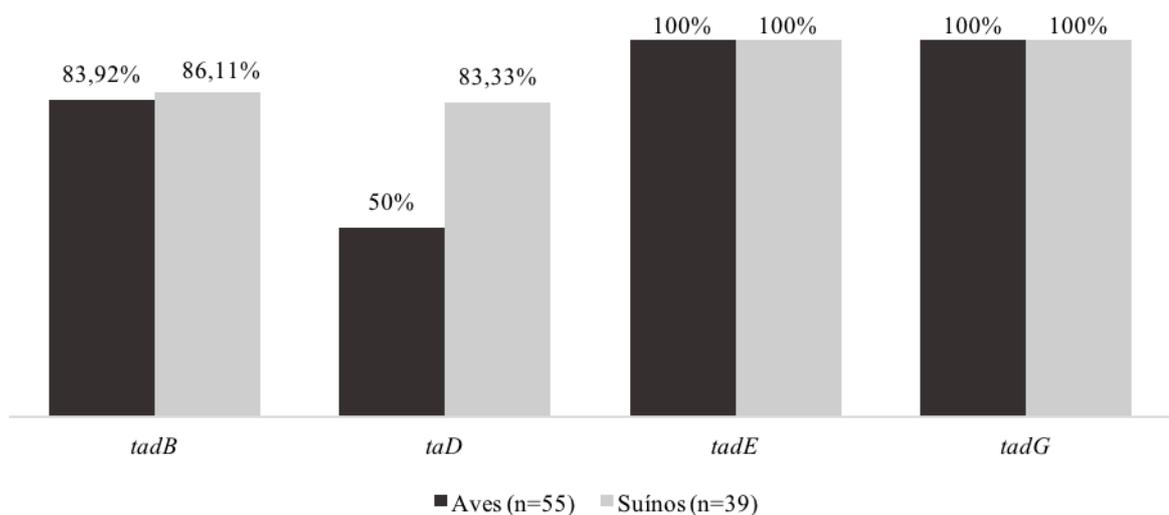


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados. Legenda: MW = marcador de peso molecular (100 pb), amostras 1 e 2 = *tadB* (150 pb), amostras 3 e 4 = *tadD* (416 pb), amostras 5 e 6 = *tadE* (195 pb), amostras 7 e 8 = *tadG* (224 pb). A seta tracejada indica um fragmento de 200 pb; a seta preenchida indica um fragmento de 500 pb.

Gráfico 2 - Frequência relativa (%) das cepas de *Pasteurella multocida* classificadas como não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras e fortemente produtoras de biofilme conforme a origem de isolamento.

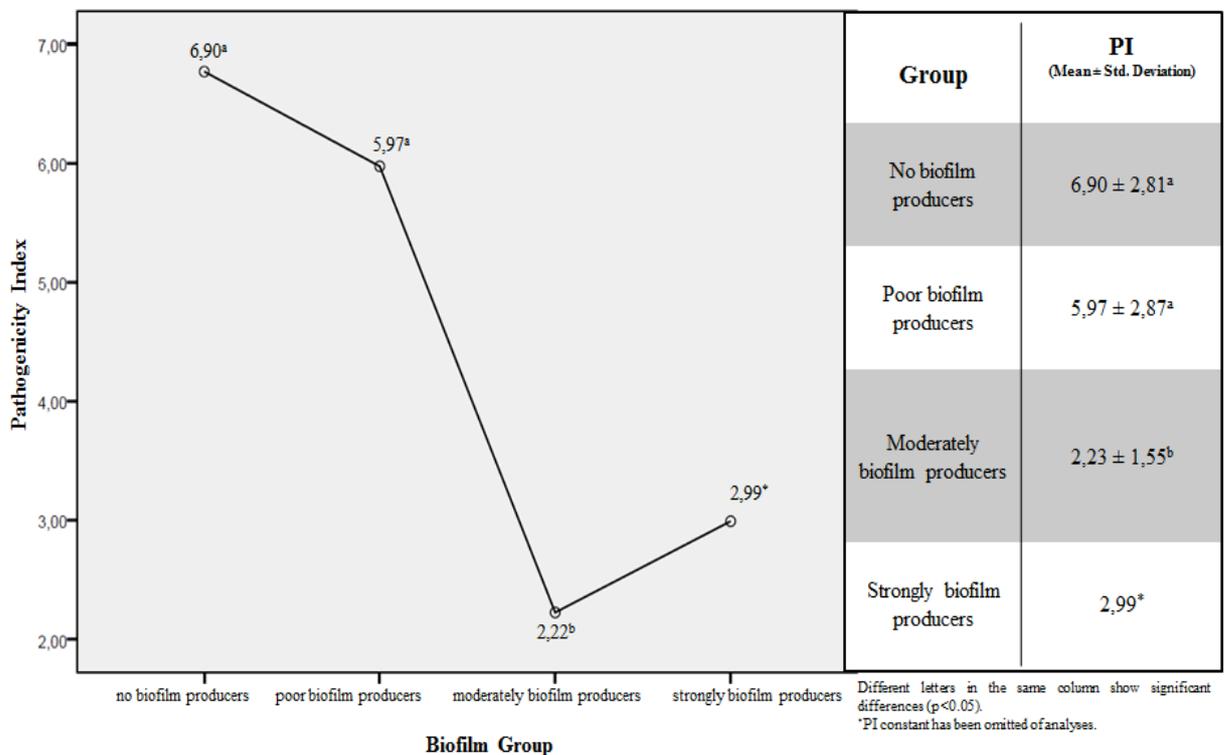


A partir da frequência dos genes pesquisados (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*) através de PCR, a relação percentual entre amostras positivas para a presença dos mesmos e a aderência bacteriana observada foi estabelecida. Do total de cepas aviárias positivas para os quatro

genes pesquisados, 61,53% foram classificadas como exemplares formadores de biofilme, incluindo-se uma cepa fortemente produtora. Entre as cepas isoladas de suínos, 57,68% apresentaram relação com níveis de aderência, sendo três classificadas como moderadamente produtoras. Contudo, a ausência individual dos genes *tadB* e *tadD* não apresentou associação significativa ( $p > 0,05$ ) com a capacidade de formação de biofilme das cepas de *P. multocida*.

Após avaliação da formação de biofilme e agrupamento das amostras, as cepas analisadas foram relacionadas com os seus respectivos IPs, anteriormente obtidos em estudo *in vivo*. O IP médio das cepas de *P. multocida* classificadas como não produtoras de biofilme apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao IP das cepas moderadamente produtoras (Gráfico 3). Da mesma forma, os exemplares classificados como fracamente produtores de biofilme diferiram significativamente do grupo de cepas moderadamente produtoras. Entretanto, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) do IP dos exemplares não produtores de biofilme e dos fracamente produtores (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Distribuição das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária e suína conforme a formação de biofilme e os índices de patogenicidade (IP) calculados a partir da inoculação experimental de pintos.



### 3. DISCUSSÃO

Diversas bactérias patogênicas estão presentes em animais constituindo biofilmes (Costerton et al. 1999). Apesar disto, pesquisas relacionadas à formação de biofilme em *P. multocida* são raras (Olson, 2002, Romanò et al. 2013). As bactérias que possuem esta capacidade aderem-se a praticamente todas as superfícies *in vitro*, desde que existam condições adequadas para a fixação. Entre estas condições, a restrição de nutrientes, como o caldo TSB sem glicose (Christensen et al. 1982) utilizado no estudo, consiste em uma condição importante para a formação de biofilmes (Dewanti & Wong 1995). Além disto, Olson e colaboradores (2002) julgaram ser necessária a suplementação com 2% de soro fetal bovino e a incubação sob 10% de CO<sub>2</sub> das amostras para a formação de biofilme de *P. multocida* em caldo TSB. Tais condições podem ser testadas em trabalhos futuros para comparação dos resultados obtidos.

Vários substratos são empregados para estimular a fixação das bactérias *in vitro*, os quais podem ser hidrofóbicos ou hidrofílicos (Rajagopal et al. 2013). O poliestireno, selecionado no estudo, é um material inerte frequentemente utilizado na avaliação da capacidade de formação de biofilme por diversas espécies bacterianas (Silva et al. 2014, Borges 2015, Narayanan et al. 2016, Salimena et al. 2016). Da mesma forma, estudo recente desenvolvido por Rajagopal et al. (2013) menciona a capacidade aderente de *P. multocida* em uma superfície inerte formada por argila bentonita, havendo o pico do crescimento de células do biofilme no terceiro dia de incubação.

O potencial de cepas de *P. multocida* para formar biofilme foi constatado no estudo através do crescimento do organismo sob restrição de nutrientes em placas de poliestireno em níveis baixos de aderência para a maioria dos isolados, tanto de origem aviária quanto suína. Apesar das cepas analisadas não terem demonstrado forte produção, assim como relatado para outras bactérias, como *Salmonella spp.* (Marquezini 2015) e *Pseudomonas aeruginosa* (Hassett et al. 2009), constatou-se que *P. multocida* apresenta a capacidade de formar biofilme *in vitro*. Assim, pesquisas sobre a capacidade de aderência deste microrganismo tornam-se fundamentais, uma vez que este é um importante patógeno respiratório e o modo de biofilme poderia contribuir para uma maior virulência do agente (Rajagopal et al. 2013).

Para avaliar esta questão, o grau de formação de biofilme foi comparado com o IP obtido para as mesmas cepas, o qual poderia ser considerado a expressão *in vivo* da patogenicidade dos isolados (Pilatti et al. 2016). A patogenicidade descreve a gama de todas as características de um microrganismo que apresentam papel na infecção e o termo

virulência descreve o nível de patogenicidade de um microrganismo específico (Kubatzky 2012). Contudo, o fato das cepas de *P. multocida* consideradas de maior patogenicidade terem demonstrado menor capacidade de formação de biofilmes no estudo sugerem que outros fatores de virulência sejam preponderantes para o processo de infecção, além da simples aderência bacteriana. Por exemplo, os principais componentes de superfície de *P. multocida*, cápsula e lipopolissacarídeo, apresentam importante papel na resistência à fagocitose, à inibição do sistema complemento e da atividade de peptídeos antimicrobianos (Wilkie et al. 2012). Além disto, outros fatores de virulência estão envolvidos com a sobrevivência do microrganismo no hospedeiro infectado (Wilson et al. 2013) e geralmente as bactérias patogênicas apresentam múltiplas adesinas a distintos tipos celulares (Harper et al. 2006, Kline et al. 2009).

Da mesma forma, a formação de biofilme consiste em um mecanismo de sobrevivência diante da restrição de nutrientes que poderia estar associada a cepas de menor virulência ou à participação de *P. multocida* em infecções secundárias. Como exemplo, *P. multocida* tem a capacidade de colonizar pulmões de suínos na forma de biofilme, causando lesões geralmente difíceis de serem tratadas devido à dificuldade na ação dos antimicrobianos e do sistema monocítico fagocitário (Donlan & Conserton 2002, Moraes et al. 2014). Apesar dos resultados obtidos, a capacidade de formação de biofilme conforme a patogenicidade das cepas deve ser novamente avaliada em trabalhos futuros a partir da obtenção de um maior número de amostras classificadas como fortemente produtoras de biofilme. Esta relação não foi possível de ser avaliada estatisticamente no atual estudo devido à presença de uma única amostra neste grupo.

Os genes do *locus tad* pertencem ao grupo de adesinas putativas (Hatfaludi et al. 2010). O sistema Tad, presente em diversos gêneros bacterianos, representa o principal subtipo de secreção do tipo III e os genes relacionados codificam proteínas necessárias para a formação da fímbria Flp que podem ser fundamentais para a formação de biofilmes (Tomich et al. 2007, Hatfaludi et al. 2010). Entre os quatro genes selecionados para análise, observou-se que *tadE* e *tadG* foram detectados em 100% dos isolados de CA e de pulmões de suínos. Já a frequência dos genes *tadB* e *tadD* foi variável em ambas as origens. De maneira semelhante, Moraes e colaboradores (2014) detectaram os genes *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadE*, *tadF* e *tadG* em 100% dos isolados de pulmões de suínos, com exceção de *tadD*, assim como relatado no atual estudo.

O gene *tadD* codifica uma adesina de aderência inespecífica (May et al. 2001) e foi anteriormente pesquisado em estudos de análise do perfil genético em cepas de *P. multocida*

isoladas de suínos, bovinos e de aves (Tang et al. 2009, Katsuda et al. 2013, Moraes et al. 2014, Furian et al. 2016). Tais pesquisas também destacam a variação na presença do gene e sua associação positiva com o sorotipo A de *P. multocida* (Tang et al. 2009) e negativa com o sorogrupo D da bactéria, como anteriormente foi observado em estudo do nosso grupo (Furian et al. 2016).

Apesar de *tadD* compor o *locus* associado com a formação de biofilmes, inclusive havendo relação da ocorrência com a presença de lesões pulmonares em suínos e bovinos (Khamesipour et al. 2013, Moraes et al. 2014), a sua presença em amostras individuais no estudo não apresentou associação significativa com a capacidade de formação de biofilme. Tal situação é provavelmente justificada pela detecção de demais genes do mesmo *locus* relacionados com a formação de biofilme e ou por mutações no gene *tadD* que interferem no potencial de aderência de *P. multocida* (Fuller et al. 2000).

#### 4. CONCLUSÃO

A avaliação da capacidade de formação de biofilme por cepas de *P. multocida* isoladas de casos de CA e do pulmão de suínos demonstrou que o microrganismo possui capacidade de adesão em superfície de poliestireno, geralmente apresentando níveis baixos de aderência. Os genes *tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*, pertencentes ao locus *tad*, foram detectados em conjunto na maioria das cepas analisadas e não houve associação significativa entre a presença dos mesmos e a origem de isolamento. Da mesma forma, não houve associação entre a presença dos genes *tadB* e *tadD* com a capacidade de formação de biofilme das cepas. Em geral, cepas de menor patogenicidade apresentaram uma maior capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno.

## REFERÊNCIAS

- Amaral, P. F. G. P. Biossegurança na criação de frangos de corte. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 10:664 2014.
- Borges, K.A. Tese de doutorado. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de salmonella pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2016.
- Cochrane C.A., Freeman K., Woods E., Welsby S. & Percival S.L. 2009. Biofilms evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can. J. Microbiol.* 55:197-202.
- Corney B.G., Diallo I.S., Wright L.L., Hewitson G.R., De Jong A.J., Burrell P.C., Duffy P.F., Stephens C.P., Boyle D.B. & Blackall P.J. 2007. *Pasteurella multocida* detection by 5' *Taq* nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J. Microbiol. Meth.* 69:376-380.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. & Lappin-Scott H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Ver. Microbiol.* 49:711-45.
- Costerton J.W., Stewart P.S. & Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318-22.
- Christensen G.D., Simpson W.A., Bison A.L. & Beachey E.H. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37: 318-326.
- Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A. & Percival S.L. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121:1-17.
- Dewanti R. & Wong A.C.L. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J Food Microbiol.* 21: 147-164.
- Donlan R.M. & Costerton J.W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2):167-193.
- Ewers C., Lübke-Becker A., Bethe A., Kiebling S., Filter M & Wieler L.H. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.* 114: 304-317.
- Ferreira T.S.P., Felizardo M.R., Gobbi D.D.S., Gomes C.R., Filsner P.H.L.N, Moreno M., Paixão R., Pereira J.J. & Moreno A.M. 2012. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in Brazil. *Sci World J.* Published online 2012 Jul 31. doi: 10.1100/2012/685028 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417173/>>.
- Fuller T.E., Kennedy M.J. & Lowery, D. E. 2000. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29:25-38.
- Furian T.Q., Borges K.A., Rocha S.L.S., Rodrigues E.E., Nascimento V.P., Salle C.T.P. & Moraes H.L.S. 2013. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. *Pesqui. Vet. Bras.* 33:177-182.
- Furian T. Q., Borges K.A., Laviniki V. S. L., Rocha S.L.S., Almeida C.N., Nascimento V.P., Salle C.T.P. & Moraes H.L.S. 2016. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Braz. J. Microbiol.* 47:210-216.
- Gerardo S.H., Citron D.M., Claros M.C., Fernandez H.T. & Goldstein E.J.C. 2001. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and  $\alpha$ -glucosidase activity. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2558-2564.
- Glisson J.R., Sandhu T.S. & Hofacre C.L. 2008. Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, riemerellosis and pseudotuberculosis. In: DUFOUR-ZAVALA, L.

- (Ed.). A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens. 5.ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, p.12-18.
- Khamesipour F., Momtaz H. & Azhdary Mamoreh M. 2014. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Front. Microbiol.* 5:536.
- Kawashima S., Matsukawa N., Ueki Y., Hattori M. & Ojika K. 2010. *Pasteurella multocida* meningitis caused by kissing animals: a case report and review of the literature. *J. Neurol.* 257:653-654.
- Kline K.A. Falker S., Dahlberg S., Normark S & Henriques-Normark B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interaction. *Cell Host Microbe.* 5:580-592.
- Kubatzky, K.F. 2012. *Pasteurella multocida* and Immune Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361: 23-38.
- Hall-Stoodley L. & Stoodley P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11:1034-1043.
- Harper M., Boyce J.D., Adler, B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:1-10.
- Hassett D.J., Sutton M.D., Schurr M.J., Herr A.B., Caldwell C.C. & Matu J.O. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol.* 17:130-138.
- Hatfaludi T., Al-Hasani K., Boyce J.D. & Adler B. 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 144:1-17.
- IBGE. Estatística de produção pecuária em 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE). 2015
- Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C & Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322:1-16.
- Marquezzini, M.G. Dissertação de Mestrado. Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da enzima KPC em *Salmonella* spp. isoladas de aviário e linha de abate de aves . Piracicaba: USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2015.
- May B.J., Zhang Q., Li L.L., Paustian M.L., Whittam T.S. & Kapur V. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:3460-3465.
- Moraes D. F. S. D., Brandão, L. N., Pitchenin, L. C., Filho, J. X. O., Morés, N., Nakazato, L. & Dutra, V. 2014. Ocorrência de genes *tad* associados à formação de biofilme em isolados de *Pasteurella multocida* de pulmões de suínos com pneumonia. *Pesqui. Vet. Bras.* 34:1147-1152.
- Narayanan A., Nair M.S., Karumathil D.P., Baskaran S.A., Venkitanarayanan K. & Amalaradjou M.A. 2016. Inactivation of *Acinetobacter baumannii* Biofilms on Polystyrene, Stainless Steel, and Urinary Catheters by Octenidine Dihydrochloride. *Front Microbiol.* 7:847.
- Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G. & Read R.R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 66:86-92.
- Pilatti R. M., Furian T.Q., Lima D.A., Finkler F., Brito B.G., Salle C.T.P & Moraes H.L.S. 2016. Establishment of a pathogenicity index for one-day-old broilers to *Pasteurella multocida* strains isolated from clinical cases in poultry and swine. *Braz. J. Poult. Sci.* 18:1-6.
- Rajagopal R., Nair G. K., Mini M., Joseph L., Saseendranath M. R. & John K. 2013. Biofilm formation of *Pasteurella multocida* on bentonite clay. *Iranian J. Microbiol.* 5:120-125.
- Ribeiro W.L.C., Pinheiro A.R.A., Evangelista J.N.B. & Sales R.O. 2012. Rinite atrofica e sua importância na indústria suinícola: uma revisão. *Revta Bras. Hig. Sanid. Anim.* 6:21-35.

- Richards J. & Melander C. 2009. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* 10:2287-2294.
- Romanò C.L., De Vecchi E., Vassena C., Manzi G. & Drago L. 2013. A case of a late and atypical knee prosthetic infection by no-biofilm producer *Pasteurella multocida* strain identified by pyrosequencing. *Pol J Microbiol.* 62:435-8.
- Ross R.F. 2006. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Anim. Health Res. Rev.* 7: 13-29.
- Salimena A.P., Lange C.C., Camussone C., Signorini M., Calvinho L.F., Brito M.A., Borges C.A., Guimarães A.S., Ribeiro J.B., Mendonça L.C. & Piccoli R.H. 2016 Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet. Res. Commun.* Ahead of print.
- Sesti, L. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais. V simpósio brasil sul de avicultura, Chapecó, SC, Brasil. 2004
- Silva C.F., Gehlen S.S., Webber B., Diedrich L.N. Pilotto F., Santos L.R., Tondo E.C., Nascimento V.P. & Rodrigues L.B. 2014. *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. *Acta Scientiae Vet.* 42:1-8.
- Stepanović S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. & Svabic-Vlahovic M. 2000. Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.* 40:175-179.
- Sutherland I. W. 1997. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. *Pure Appl. Chem.* 69:1911-1917.
- Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu, B., Cai, X., He Q. & Chen, H. 2009. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 47:951-958
- Tomich M., Planet P.J. & Figurski D.H. 2007. The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev.* 5:363-375.
- UBABEF. Relatório anual 2014. Uniao Brasileira de Avicultura. UBABEF. 2014.
- Wilkie I.W., Harper M. & Adler B. 2012. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:1-22.
- Zanatta, D. Associação Gaúcha de Avicultura e Sindicato das Indústrias de Produção Avícolas no RS. 2008. Disponível em: [www.cpact.embrapa.br/eventos/2008](http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2008). Acesso em: maio, 2011.