

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

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS DE
PASTEURELLA MULTOCIDA

Tese de doutorado

Autor: Thales Quedi Furian

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

PORTO ALEGRE

2015

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

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS DE
PASTEURELLA MULTOCIDA

Autor: Thales Quedi Furian

**Tese apresentada como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva, especialidade de Sanidade
Avícola**

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Quedi Furian, Thales

Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Pasteurella multocida* / Thales Quedi Furian. -- 2015. 135 f.

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. avicultura. 2. pasteurelose. 3. susceptibilidade antimicrobiana. 4. patogenicidade. 5. genes de virulência . I. Luiz de Souza Moraes, Hamilton, orient. II. Título.

Thales Quedi Furian

“CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CEPAS DE
PASTEURELLA MULTOCIDA”

Aprovada em 27 NOV 2015

APROVADO POR:

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Membro da Comissão

Prof. Dra. Maristela Lovato Flores

Membro da Comissão

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ter iluminado o meu caminho e pela saúde plena para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Arno e Jussara pelo apoio em todas as fases da minha vida. Sou eternamente grato pelo esforço incondicional, pela dedicação como educadores e, especialmente, pelo exemplo de seres humanos que me orgulha como filho.

Ao meu irmão Thiago, um segundo pai na minha vida. Obrigado pelo companheirismo e pela união que nos faz muito mais do que irmãos. Também agradeço pelo nascimento da pequena Bibiana no decorrer deste trabalho, o maior tesouro da família.

A Karen, tanto à companheira, quanto à colega de trabalho que sempre me auxiliou. Neste período dividimos esforços, algumas tristezas e muitas alegrias. Obrigado por estar sempre ao meu lado, tanto nos dias de céu de brigadeiro, quanto nos momentos de turbulência.

A todos os estagiários, pós-graduandos, professores e demais funcionários do CDPA que me auxiliaram na realização das diferentes etapas deste trabalho. Um agradecimento especial às estagiárias Camila e Suelle que acompanharam a maior parte das atividades realizadas.

Ao colega Silvio pela amizade de muitos anos e pela disponibilidade em qualquer hora e em qualquer dia para discutirmos nossos projetos e dividirmos nossos pensamentos e anseios.

À colega Roberta pelo envolvimento no projeto e pela autoria da classificação *in vivo* da patogenicidade das cepas selecionadas, uma etapa fundamental para se atender a um dos objetivos deste estudo.

Ao meu chefe imediato, Prof. Carlos Tadeu Pippi Salle, pelo auxílio neste trabalho e pelo estímulo constante para a minha qualificação. Obrigado pelas opiniões, sugestões e críticas valiosas para a melhoria deste estudo.

Ao meu orientador, Prof. Hamilton Luiz de Souza Moraes, pela oportunidade e pela confiança. Obrigado pelo exemplo de professor e de veterinário que tanto eu admiro após todos estes anos de convívio.

RESUMO

Entre as bactérias que habitam a cavidade oral e nasal dos animais, os constituintes da família *Pasteurellaceae* estão entre os microrganismos comensais ou oportunistas mais prevalentes. Apesar do número de doenças associadas e da diversidade de hospedeiros acometidos, o conhecimento sobre a patogenia desta bactéria ainda é restrito. Além disto, a análise da virulência de *Pasteurella multocida*, que ocasiona casos agudos e crônicos de cólera aviária, não é comum. Tais estudos são ainda mais raros para cepas circulantes no Brasil. O objetivo deste trabalho foi a caracterização fenotípica e molecular de 96 cepas de *P. multocida* isoladas de aves e de suínos no país. As subespécies e os biovars foram determinados através de testes bioquímicos, e os sorogrupos foram classificados pelo emprego de testes fenotípicos não sorológicos. A susceptibilidade *in vitro* a nove antimicrobianos também foi avaliada. Para os estudos genotípicos, foi realizada a pesquisa de 22 genes de virulência por multiplex-PCR, incluindo-se aqueles determinantes dos sorogrupos, a comparação dos perfis genéticos e a diferenciação molecular através de PCR-RFLP a partir dos genes *ompH* e *oma87*. Por último, os testes fenotípicos e moleculares para classificação dos sorogrupos foram comparados, e a distribuição dos genes foi relacionada com índices de patogenicidade *in vivo* das cepas para a identificação de marcadores moleculares. Um total de 87,5% (84/96) das cepas foi classificado na subespécie *multocida*. O biovar 3 foi o mais comum entre as cepas aviárias e suínas, sendo identificado respectivamente em 35,7% (20/56) e 25% (10/40) dos casos. Entre as cepas aviárias, 90,7% (49/54) foram classificadas no sorogrupo A através do multiplex-PCR, e 3,7% (2/54) não foram classificados em um dos dois sorogrupos. Em contraste, somente 75,9% (41/54) das cepas aviárias foram identificadas no tipo capsular A através do teste fenotípico e 20,4% (11/54) não foram tipificadas. Resultados semelhantes foram observados entre os isolados suínos. As taxas de susceptibilidade das cepas aviárias foram superiores a 80% para os antimicrobianos testados, com exceção à enrofloxacina e ao sulfafurazol. Somente amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina inibiram o crescimento de mais de 80% das cepas suínas. 8,9% (5/56) dos isolados de origem aviária e 37,5% (15/40) das cepas suínas foram multirresistentes. A maioria dos genes (*ompH*, *oma87*, *psl*, *plpB*, *exbD-tonB*, *fur*, *hgbA*, *nanH*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *pmHAS*, *ptfA*) apresentou uma frequência superior a 90% e distribuição regular, independentemente da origem. As cepas foram agrupadas em 33 perfis, sendo o perfil 1 (*toxA*⁻; *pfhA*⁻; *dcbF*⁻; *cbpD*⁻; *hsf-1*⁻) o mais frequente, identificado em 16,7% (16/96) dos casos. O PCR-RFLP a partir do gene *ompH* permitiu a classificação das cepas aviárias em sete grupos moleculares, sendo predominante o grupo II, identificado em 42,9% (24/56) das situações. A detecção do gene *pfhA* indica a presença de cepas de alta patogenicidade em aves, e em segundo lugar, de cepas intermediárias. Este estudo proveu a caracterização fenotípica e molecular de cepas de *P. multocida* isoladas de aves e de suínos no Brasil e os seus resultados possibilitam a distinção futura dos isolados aviários quanto à patogenicidade.

Palavras-chave: pasteurelose, biovar, susceptibilidade antimicrobiana, PCR-RFLP, genes de virulência, patogenicidade.

ABSTRACT

The constituents of the Pasteurellaceae family are among the most prevalent commensal microorganisms or opportunistic pathogens that inhabit the oral and nasal cavity of the animals. The knowledge of the pathogenesis of this bacterium is still restricted, despite the number of related diseases and diversity of affected hosts. Similarly, analysis of the virulence of Pasteurella multocida, that causes acute and chronic cases of fowl cholera, is not common. Such studies are even rarer for the circulating strains in Brazil. The present work aimed to the phenotypic and molecular characterization of ninety-six P. multocida strains isolated from poultry and swine in the country. The subspecies and biovars were determined through biochemical scheme and the serogroups or capsular types were classified by employing non-serologic phenotypic tests. Furthermore, the susceptibility to nine antimicrobial agents was evaluated. For genotypic studies, the investigation of twenty-two virulence genes by multiplex-PCR, including those that are serogroups determinants, the comparing of the genetic profiles and the molecular differentiation by PCR-RFLP from ompH e oma87 were performed. Finally, the results of phenotypic and molecular tests for classification of serogroups were compared and the distribution of genes was related to in vivo pathogenic indices of strains for identification of molecular markers. 87.5% (84/96) of the strains were classified in multocida subspecies. The biovar 3 was more common among avian and swine strains, identified respectively in 35.7% (20/56) and 25% (10/40) of cases. Among avian strains, 90.7% (49/54) were classified in serogroup A by multiplex-PCR and 3.7% (2/54) were not classified in one of two serogroups. In contrast, only 75.9% (41/54) of avian strains were identified in the capsular type A through phenotypic test and 20.4% (11/54) were not typed. Similar results were observed among swine isolates. The susceptibility rates of avian strains were above 80% for the tested antimicrobials, except to enrofloxacin and sulfafurazol. Only amoxicillin, gentamicin and ciprofloxacin inhibited the growth of more than 80% of the swine strains. 8.9% (5/56) of avian isolates and 37.5% (15/40) of swine strains were multidrug-resistant. The majority of genes (ompH, oma87, psl, plpB, exbD-tonB, fur, hgbA, nanH, nanB, soda, sodC, pmHAS, ptfA) had a frequency higher than 90% and regular distribution, regardless of source. The strains were grouped in 33 profiles and profile I (toxA⁻; pfhA⁻; dcbF⁻; bcbD⁻; hsf-I⁻) was most frequent, identified in 16.7% (16/96) of cases. The PCR-RFLP from ompH gene allowed the classification of avian strains in seven molecular groups. The predominant group II was identified in 42.9% (24/56) of cases. The detection of pfhA gene indicates the presence of highly pathogenic avian strains, and secondly, of intermediate strains. This study provided the phenotypic and molecular characterization of P. multocida isolated from poultry and swine in Brazil and its results enable future distinction of avian strains according the pathogenicity.

Keywords: pasteurellosis, biovar, antimicrobial susceptibility, PCR-RFLP, virulence genes, pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo com os grupos gerados (I, II, V, VI, VII) das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária a partir da clivagem do produto de amplificação do gene *ompH* com a enzima *DraI*..... 80
- Figura 2 -** Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo com os grupos gerados (III, IV) das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária a partir da clivagem do produto de amplificação do gene *ompH* com a enzima *HindIII*..... 81
- Figura 3 -** Árvore filogenética demonstrando a relação entre a sequência nucleotídica do gene *ompH* dos grupos moleculares do PCR-RFLP e de cepas de diferentes sorotipos de *Pasteurella multocida*..... 88
- Figura 4 -** Diagrama esquemático da árvore de inferência condicional para determinação de genes indicadores de patogenicidade das 56 cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves..... 89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Susceptibilidade antimicrobiana das 56 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária frente aos nove antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar.....	60
Gráfico 2 -	Susceptibilidade antimicrobiana das 40 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem suína frente aos nove antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar.....	61
Gráfico 3 -	Distribuição das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária conforme os grupos moleculares obtidos através do PCR-RFLP e os índices de patogenicidade (IP) calculados a partir da inoculação experimental de pintos.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição e concentração do mix de reação dos protocolos de PCR para os genes <i>hsf-1</i> , <i>pmHAS</i> , <i>fur</i> , <i>psl</i> , <i>ompA</i> , <i>plpB</i> e <i>tadD</i>	47
Tabela 2 -	Condições do termociclador adotadas para os protocolos de PCR para os genes <i>hsf-1</i> , <i>pmHAS</i> , <i>fur</i> , <i>psl</i> , <i>ompA</i> , <i>plpB</i> e <i>tadD</i>	47
Tabela 3 -	Genes selecionados para o PCR-RFLP, processo ou função enzimática relacionada, sequência e referência dos primers, tamanho dos amplicons.....	49
Tabela 4 -	Condições do termociclador adotadas para os protocolos de PCR dos genes <i>ompH</i> e <i>oma87</i> que foram selecionados para posterior digestão enzimática.....	49
Tabela 5 -	Frequências absoluta e relativa (%) das subespécies de <i>Pasteurella multocida</i> identificadas através de testes bioquímicos conforme a origem das cepas analisadas.....	54
Tabela 6 -	Frequência relativa (%) dos biovares de <i>Pasteurella multocida</i> identificados conforme a origem das cepas analisadas.....	57
Tabela 7 -	Frequência relativa (%) dos biovares de <i>Pasteurella multocida</i> identificados nas cepas analisadas e distribuídos conforme a subespécie.....	58
Tabela 8 -	Frequências absoluta e relativa (%) dos sorogrupos de <i>Pasteurella multocida</i> identificados através dos testes fenotípicos não sorológicos conforme a origem das cepas analisadas.....	60
Tabela 9 -	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos avaliados para as cepas de <i>Pasteurella multocida</i> independentemente da origem que apresentaram resultado intermediário através do teste de disco-difusão em ágar.....	64
Tabela 10 -	Distribuição dos 22 genes de virulência nas cepas de <i>Pasteurella multocida</i> detectados por PCR conforme o hospedeiro de origem.....	65
Tabela 11 -	Frequências absoluta e relativa (%) dos genes de virulência detectados através de PCR conforme os sorogrupos A e D das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> analisadas.....	71
Tabela 12 -	Ocorrência (%) dos genes de virulência aos pares para as 96 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> analisadas.....	73

Tabela 13 -	Tipificação capsular de 54 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.....	74
Tabela 14 -	Tipificação capsular das 40 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem suína através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.	74
Tabela 15 -	Comparação dos resultados de tipificação capsular de 54 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.....	76
Tabela 16 -	Comparação dos resultados de tipificação capsular das 40 cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem suína através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.....	77
Tabela 17 -	Grupos moleculares das cepas de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária obtidos no PCR-RFLP a partir da análise de um fragmento do gene <i>ompH</i> e da digestão com as endonucleases de restrição <i>DraI</i> e <i>HindIII</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APINCO	Associação Brasileira de Produtores de Pinto de Corte
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
CA	Cólera Aviária
Cbiot	Centro de Biotecnologia
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HAI	Hemaglutinação Indireta
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IgG1	Imunoglobulina G1
IP	Índice de Patogenicidade
Kb	Quilobase (= 1.000 pares de base)
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	<i>Multidrug Resistant</i>
mL	Mililitro
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
ng	Nanograma
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>

OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
pmol	Picomol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PmHAS	<i>Hyaluronan Synthase</i>
PmHS1	<i>Heparosan Synthase</i>
PMT	<i>Pasteurella multocida Toxin</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
REA	<i>Restriction Endonuclease Analysis</i>
REP	<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	rotações por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
s	Segundo
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por Mililitro
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por Mililitro
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
χ^2	Qui-Quadrado
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
D	Índice de diversidade de Simpson ou poder discriminatório
Gene ⁻	Gene ausente
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
K	Coeficiente Kappa
T	Tipabilidade
U	Unidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Família <i>Pasteurellacea</i> e <i>Pasteurella multocida</i>	18
3.2	Testes fenotípicos para classificação da subespécie e do biovar	19
3.3	Cólera Aviária e epidemiologia	20
3.4	Patogenia	24
3.5	Fatores de virulência	26
3.6	Cápsula	29
3.6.1	Métodos de tipificação capsular	32
3.7	Tipificação molecular dos isolados e PCR-RFLP	34
3.8	Resistência antimicrobiana	37
3.8.1	Testes de sensibilidade antimicrobiana	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Cepas de <i>Pasteurella multocida</i>	42
4.2	Caracterização fenotípica	42
4.2.1	Identificação da subespécie e do biovar	43
4.2.2	Testes fenotípicos para identificação do tipo capsular	43
4.2.3	Testes de sensibilidade antimicrobiana	44
4.3	Caracterização genotípica	46
4.3.1	Extração do DNA	46
4.3.2	Pesquisa de genes associados à virulência	46
4.3.3	PCR-RFLP	48
4.3.4	Sequenciamento	50
4.4	Identificação de genes marcadores de patogenicidade	51
4.5	Análises estatísticas	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Caracterização fenotípica	54
5.1.1	Identificação da subespécie e do biovar	54

5.1.2	Testes fenotípicos para identificação do tipo capsular	59
5.1.3	Testes de sensibilidade antimicrobiana	60
5.2	Caracterização genotípica	65
5.2.1	Distribuição dos genes associados à virulência	65
5.2.2	Perfis dos genes associados à virulência e dendograma	70
5.2.3	Associação entre genes de virulência e sorogrupos	72
5.2.4	Comparação dos resultados de tipificação dos sorogrupos A e D através dos testes fenotípicos e do multiplex-PCR	76
5.2.5	Tipabilidade e poder discriminatório dos protocolos de PCR-RFLP	79
5.2.5.1	Associação dos grupos do PCR-RFLP com biovares, sorogrupos e índices de patogenicidade	84
5.2.5.2	Análise do sequenciamento	87
5.3	Identificação de genes marcadores de patogenicidade	88
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A	116
	APÊNDICE B	120
	APÊNDICE C	121
	APÊNDICE D	122
	APÊNDICE E	123
	APÊNDICE F	126
	APÊNDICE G.....	127
	APÊNDICE H	128
	APÊNDICE I	129
	ARTIGOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS	130

1 INTRODUÇÃO

A avicultura nacional historicamente oferece relevante contribuição ao desenvolvimento da economia brasileira. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o saldo altamente positivo das exportações do agronegócio brasileiro compensa e equilibra o saldo negativo de outros setores produtivos. Dentre os principais produtos exportados, o complexo de carnes ocupa a segunda posição com contribuição preponderante das carnes de frango e bovina (FILHO; TALAMINI, 2014).

Conforme os dados apresentados pela 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, dados que representam um crescimento de 3% em relação ao ano de 2013 (AVEWORLD, 2015). Este resultado mantém o país como o terceiro maior produtor avícola mundial com a significativa participação em praticamente 15% da produção internacional (USDA, 2014). Também de acordo com a APINCO, o consumo per capita de carne frango de 43,8 Kg por habitante no país representa um leve crescimento em relação a 2013 (AVEWORLD, 2015). Entretanto, ao contrário de anos anteriores em que o aumento do consumo foi em parte justificado pela melhor renda financeira da população, o pequeno crescimento dos números em 2014 é resultante da migração do consumo de proteína bovina para a de frango em função da diferença de preços e da estagnação da economia brasileira. Além dos bons números de consumo interno, a avicultura brasileira manteve-se em 2014 com o custo das matérias-primas controlado e com advento de novos mercados compradores, como o russo e o venezuelano. Assim, estima-se um aumento de 3% das exportações nacionais de carne de frango no ano de 2015 (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014; UBABEF, 2014).

Contudo, a importância de uma atividade produtiva é mais claramente demonstrada pelo número de habitantes que socialmente dependem do setor. No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por aproximadamente 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) (UBABEF, 2014). Além disto, existe uma correlação espacial entre as atividades de emprego no setor de avicultura e de suinocultura com municípios que apresentam um alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (FILHO, 2014 *apud* FILHO; TALAMINI, 2014).

O destaque socioeconômico da avicultura nacional é dependente de fatores voláteis como as condições de exportação, o preço da ração e o status sanitário dos planteis. A ocorrência de surtos de doenças infecciosas nas aves é uma ameaça contínua

para a indústria, tornando-se a prevenção e as pesquisas desenvolvidas na área um tema importante para o desenvolvimento da atividade. O risco de um surto pode ser acentuado para aquelas enfermidades de fácil disseminação, como as doenças respiratórias, e para aquelas cujos agentes etiológicos possuem mais de um hospedeiro. Entre as doenças com estas características está a Cólera Aviária (CA), que geralmente apresenta-se de forma aguda, septicêmica e com altos índices de morbidade e de mortalidade dos lotes. Da mesma forma, *Pasteurella multocida* é o agente causador de rinite atrófica em suínos, além de ser um fator importante no desenvolvimento de pneumonias neste hospedeiro.

O aumento da incidência de CA em regiões com precários controles, associado à dificuldade de isolamento bacteriano a partir de regiões normalmente contaminadas motivou o desenvolvimento do primeiro trabalho sobre este tema no CDPA a partir da padronização de um protocolo de PCR para a detecção do agente (dados não publicados). Apesar da forma septicêmica que resulta em alta mortalidade ser predominante em CA, lesões edematosas em casos crônicos também podem ocorrer. A variabilidade da manifestação clínica é possivelmente justificada pelo desequilíbrio da relação entre hospedeiro e bactéria, assim como pela presença de fatores de virulência que diferem os microrganismos patogênicos de uma mesma espécie. Desta forma, o objetivo do segundo estudo elaborado em 2011 foi pesquisar quinze genes associados à virulência em isolados de casos clínicos de CA, além de otimizar a detecção dos mesmos através do uso da técnica de multiplex-PCR (FURIAN, 2011). A partir da obtenção do perfil genético das cepas, idealizou-se a determinação de um índice de patogenicidade através da inoculação experimental em pintos (PILATTI, 2014).

A caracterização fenotípica e molecular de cepas de *P. multocida* foram os objetivos do atual trabalho. Por último, os resultados obtidos na caracterização genotípica foram relacionados com os índices de patogenicidade resultantes das inoculações experimentais para a identificação de possíveis marcadores moleculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterização fenotípica e genotípica de *Pasteurella multocida* e relação com a patogenicidade das cepas.

2.2 Objetivos Específicos

- Classificação da subespécie e do biovar das cepas de origem aviária e suína de *Pasteurella multocida* através da fermentação de carboidratos e da atividade da enzima ornitina descarboxilase.
- Identificação dos tipos capsulares ou sorogrupos A e D de *Pasteurella multocida* entre os isolados de origem aviária e suína através dos testes fenotípicos não sorológicos da hialuronidase e da acriflavina.
- Identificação molecular dos tipos capsulares ou sorogrupos A e D de *Pasteurella multocida* entre os isolados de origem aviária e suína e avaliação da capacidade de tipificação através de testes fenotípicos não sorológicos e de multiplex-PCR.
- Determinação da susceptibilidade antimicrobiana e da multirresistência das cepas de origem aviária e suína de *Pasteurella multocida* frente a nove antimicrobianos através da técnica de disco difusão em ágar e de microdiluição em caldo e associação com os índices de patogenicidade das cepas obtidos em estudo *in vivo*.
- Pesquisa de 22 genes associados à virulência em *Pasteurella multocida* entre as cepas de origem aviária e suína através da técnica de multiplex-PCR, agrupamento das cepas em perfis genéticos e análise da distribuição dos genes conforme a origem e o sorogrupo.
- Avaliação da capacidade de tipificação molecular dos isolados aviários de *Pasteurella multocida* através de dois diferentes protocolos da técnica de PCR-RFLP e associação com biovars, tipos capsulares ou sorogrupos e com índices de patogenicidade das cepas obtidos em estudo *in vivo*.
- Associação dos 22 genes pesquisados com os índices de patogenicidade das cepas obtidos em estudo *in vivo* para a determinação de genes considerados marcadores de patogenicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família *Pasteurellacea* e *Pasteurella multocida*

A bactéria *Pasteurella multocida* é um patógeno enigmático conhecido pela diversidade de síndromes em que está associada e pela grande extensão de hospedeiros que pode acometer (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Entre as centenas de bactérias que habitam a cavidade oral e nasal dos animais, os constituintes da família *Pasteurellaceae* estão entre os microrganismos comensais ou patógenos oportunistas mais prevalentes, especialmente envolvidos em enfermidades respiratórias (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; WILSON; HO, 2013). Além disto, são agentes primários ou que apresentam o principal papel na evolução de determinadas doenças. Entre estas, *P. multocida* é o agente causador da septicemia hemorrágica em bovinos, da rinite atrófica em suínos, além da Cólera Aviária (CA) em aves, todas enfermidades de grande impacto econômico nos animais (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; GLISSON, 2008; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

Esta família que representa um grupo diverso de bactérias é constituída por dezenove gêneros, dentre os quais se destacam *Pasteurella*, *Actinobacillus* e *Avibacterium* (PARTE, 2014). O surgimento das técnicas moleculares permitiu a diferenciação de cepas e o desenvolvimento de estudos filogenéticos. Assim, a relação ancestral entre as classificações bacterianas dentro da família *Pasteurellaceae*, inferida através da análise comparativa da sequência do ácido ribonucléico (RNA) da porção ribossomal 16S ou da comparação dos genomas sequenciados, tem revelado que muitos membros deste diverso grupo são passíveis de reclassificações (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; WILSON; HO, 2013; NAUSHAD *et al.*, 2015). Como exemplo, muitos dos agentes etiológicos que causam doenças respiratórias em aves, e que antigamente pertenciam ao gênero *Pasteurella*, foram designados em novas famílias ou gêneros (GLISSON, 2008). Contudo, apesar das mudanças, os gêneros *Actinobacillus*, *Pasteurella* e *Haemophilus* ainda apresentam membros com as taxonomias e filogenias inconclusivas, logo, são passíveis de novas classificações (NAUSHAD *et al.*, 2015).

A análise gênica da porção ribossomal 16S também demonstra que as cepas de *P. multocida* sequenciadas até o momento são fortemente agrupadas e distantes da bactéria *Haemophilus influenzae*, primeiro membro da família *Pasteurellaceae* que teve o genoma completamente sequenciado (BOYCE *et al.*, 2012). Por outro lado, a análise

de similaridade de genes conservados entre as mesmas cepas de *P. multocida* apresenta diferenças sutis de parentesco, o que provavelmente reflete a dinâmica da frequente transferência de genes dentro do grupo (WILSON; HO, 2013).

O gênero *Pasteurella* é distinguido fenotipicamente de outros membros da família pela não formação de β -hemólise, pela não fermentação da melibiose e pela produção de ácido a partir da fermentação dos açúcares frutose, galactose e manose (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). A espécie *P. multocida*, considerada a mais importante do gênero em medicina veterinária, consiste em um bacilo Gram-negativo, imóvel e não formador de esporos (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). Tende a formar bacilos largos, contudo o pleomorfismo é observado após repetidos cultivos (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). Também a bipolaridade típica das células frequentemente observada após a coloração de esfregaços sanguíneos recentes pela técnica de Gram ou com azul de metileno pode ser perdida após subcultivos (DZIVA *et al.*, 2008). É um microrganismo anaeróbico facultativo que apresenta temperatura ótima de crescimento a 37°C em uma faixa de pH entre 7,2 e 7,8 (GLISSON, 2008).

3.2 Testes fenotípicos para classificação da subespécie e do biovar

As cepas isoladas de diferentes hospedeiros ou doenças geralmente são indistinguíveis através de simples testes bioquímicos. A biotipificação pode apresentar um menor valor em estudos epidemiológicos quando comparada com outras técnicas moleculares, contudo consiste no método mais tradicional para identificação de uma espécie bacteriana isolada e permanece como um fator chave na identificação de *P. multocida* (DZIVA *et al.*, 2008). Em 1985, Mutters e colaboradores estabeleceram um padrão de diferenciação de acordo com a hibridização do DNA e com a fermentação dos açúcares sorbitol, trealose e dulcitol, classificando a bactéria em três diferentes subespécies: *multocida*, *septica* e *gallicida*. Conforme a classificação desenvolvida por Mutters *et al.* (1985), a habilidade em fermentar o sorbitol exclui a afiliação dos isolados à subespécie *septica*. Além disto, a subespécie *gallicida*, ao contrário das demais, fermenta arabinose e não fermenta trehalose (FEGAN; BLACKALL; PAHOFF, 1995).

A análise da diversidade genética das subespécies de *P. multocida* investigada através da comparação da sequência nucleotídica da porção ribossomal 16S demonstra uma similaridade do DNA das cepas classificadas bioquimicamente em cada subespécie

que varia entre 84 a 100%. As cepas filogeneticamente identificadas na subespécie *septica* são claramente distintas das outras duas subespécies (DAVIES, 2004).

Todas as subespécies já foram descritas em surtos de CA (GLISSON; SANDHU; HOFACRE, 2008), entretanto a estirpe *multocida* é a mais isolada de galinhas e de perus, conforme demonstraram Snipes *et al.* (1990) que classificaram 520 cepas de *P. multocida* isoladas entre 1985 e 1988 na Califórnia, Estados Unidos. Da mesma forma, Fegan, Blackall e Pahoff (1995) caracterizaram fenotipicamente 110 isolados - 67 provenientes de galinhas, 42 de perus e 01 de pato - e observaram que 91 cepas foram identificadas como pertencentes à subespécie *multocida*. Também, a maioria das cepas isoladas em suínos é classificada na mesma subespécie, como demonstra o extenso trabalho desenvolvido por Varga, Sellyei e Magyar (2007) na Hungria.

Entretanto, a discriminação em subespécies através dos testes bioquímicos pode apresentar resultados ambíguos e a utilização de técnicas moleculares consiste em uma alternativa (CHRISTENSEN *et al.*, 2007; VARGA *et al.*, 2007). Mais recentemente, estudos baseados na atividade da enzima α -Glicosidase e na comparação filogenética do sequenciamento de genes *housekeeping* também têm sido empregados para esta classificação (GERARDO *et al.*, 2001; KUHNERT; KORCZAK, 2006).

Além do emprego de açúcares essenciais para a determinação da subespécie de *P. multocida*, um extenso esquema fenotípico para a classificação das cepas em biovars ou tipos bioquímicos é descrito (VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007; STAHEL *et al.*, 2009; VARGA *et al.*, 2013, CASTILLO *et al.*, 2014). Estes estudos são baseados no esquema de classificação de *P. multocida* em 13 diferentes biovars a partir da habilidade dos isolados em fermentar os carboidratos sorbitol, dulcitol, maltose, xilose, trehalose, lactose e a partir da produção da enzima ornitina descarboxilase (FEGAN; BLACKALL; PAHOFF, 1995; BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997). O biovar 3 é o mais comumente identificado, tanto em cepas isoladas de aves quanto de suínos (GARCIA *et al.*, 2011; VARGA *et al.*, 2013).

3.3 Cólera Aviária e epidemiologia

A CA na sua forma típica caracteriza-se por desenvolver uma doença septicêmica que resulta em alta morbidade e alta mortalidade (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Aves doentes geralmente

apresentam anorexia, cianose, estertores, descargas nasais e diarreia aquosa ou verde-mucoide. Entretanto, a morte sem manifestação de sinais clínicos pode ocorrer em alguns surtos, sendo possível encontrar reprodutoras mortas nos ninhos (BACK, 2010). Logo, a apresentação aguda da CA deve ser diferenciada de casos suspeitos de envenenamento, de influenza aviária e de doença de Newcastle (GLISSON, 2008). A forma crônica da doença tende a apresentar lesões edematosas ou inflamatórias associadas com o local da infecção, sendo mais comuns as barbelas, os seios nasais e as articulações em geral (BACK, 2010). As lesões microscópicas consistem em áreas de necrose multifocal com a presença de colônias bacterianas e de infiltrados inflamatórios (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

A maioria dos surtos de CA afeta galinhas, perus, patos e gansos (GLISSON, 2008). Atualmente, a doença é conhecida como um dos principais problemas nas criações emergentes em sistema *free-range* de postura em países desenvolvidos (SINGH *et al.*, 2013), além da ocorrência comum em criações artesanais nas nações em desenvolvimento (MUHAIRWA *et al.*, 2001). Se por um lado todas as aves são geralmente susceptíveis às cepas mais virulentas, há variação na susceptibilidade das diferentes espécies aviárias para uma mesma cepa de *P. multocida* (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

Entre as aves domésticas, os perus são mais susceptíveis, principalmente entre 16 e 40 semanas de idade (GLISSON, 2008). A CA ocorre com maior frequência durante as estações com temperaturas mais baixas. Esta sazonalidade é devido às circunstâncias que provocam a queda da resistência do organismo das aves e também devido a uma maior exposição aos fatores de susceptibilidade (SAMUEL; BOTZLER; WOBESER, 2007; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

A epidemiologia dos surtos de CA demonstra que a maior fonte de contaminação são outras aves portadoras, consideradas o principal reservatório da infecção (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Neste contexto, Muhairwa, Christensen e Bisgaard (2000) realizaram o primeiro isolamento de *P. multocida* em lotes de galinhas sem histórico da doença através de suabes cloacais. A bactéria presente na região cloacal ou nas secreções orais contamina a água, a ração e o ambiente de produção (CHARLTON *et al.*, 2006; BACK, 2010).

Outro importante fator de risco à avicultura industrial é a ocorrência de surtos de CA em aves silvestres em regiões onde há produção avícola intensiva (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). A CA é descrita em um grande número de animais, incluindo-

se cerca de 100 espécies de aves silvestres (KASTEN *et al.*, 1997). Contudo, nem todas as cepas de *P. multocida* são patogênicas a estas espécies, sendo um indicativo de que as aves silvestres podem ser um reservatório da bactéria em surtos de CA (SNIPES *et al.*, 1990). Esta possível relação motivou a realização do trabalho de Petersen *et al.* (2001), que infectaram experimentalmente galinhas, perus, perdizes e faisões com uma cepa isolada de aves silvestres na Europa. O reisolamento bacteriano e a alta mortalidade dos animais desafiados confirmaram as aves silvestres como reservatório do agente e a necessidade da adoção contínua das práticas de biossegurança (PETERSEN *et al.*, 2001).

As espécies de aves aquáticas também são altamente susceptíveis a CA e estão relacionadas à ocorrência de surtos em aves domésticas (GLISSON, 2008). Através do emprego das técnicas moleculares de ribotipagem e de análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição, Christensen, Dietz e Bisgaard (1998) observaram que os surtos ocorridos em aves aquáticas e domésticas na Dinamarca em 1996 eram causados pelo mesmo clone de *P. multocida*. Utilizando-se das mesmas técnicas, outro estudo relatou o parentesco genético das cepas isoladas de surtos em gansos e em perus em regiões geográficas próximas na Hungria (KARDOS; KISS, 2005).

Os casos de CA são comuns entre gansos e patos, tanto em criações semi-intensivas como em áreas de reservas ambientais (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009; BACK, 2010). As ocorrências em aves aquáticas são comumente associadas com uma grande concentração de animais e com altas taxas de mortalidade. Estas características sugerem a exposição das aves a um local comum de infecção, no caso, fontes de água (SAMUEL; BOTZLER; WOBESER, 2007). Diversas áreas de reserva de vida selvagem nas costas leste e oeste dos Estados Unidos são enzoóticas para CA e os reservatórios de água podem estar relacionados com os casos sazonais (GLISSON, 2008). Em investigação realizada no *Sacramento National Wildlife Refuge*, Lehr *et al.* (2005) isolaram *P. multocida* em seis de dez diferentes áreas alagadiças analisadas. Contudo, as condições físico-químicas da água não apresentam relação com a quantidade e a viabilidade da bactéria (LEHR *et al.*, 2005; BLANCHONG *et al.*, 2006). Além disto, a bactéria não é isolada de todas as águas ambientais em surtos de CA e as aves selvagens migratórias podem estar associadas com os surtos recorrentes (SAMUEL *et al.*, 2005).

Da mesma forma que as aves silvestres, muitas espécies de mamíferos são carreadores de *P. multocida* e podem contaminar as aves domésticas (CHARLTON *et*

al., 2006). Gatos e roedores são importantes reservatórios nas granjas avícolas e em criações semi-intensivas (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). Em uma investigação epidemiológica realizada em sistemas de produção *free-range* no continente africano, isolou-se a bactéria de 68% dos gatos da região estudada (MUHAIRWA *et al.*, 2001). Recentemente, Singh e colaboradores (2014) confirmaram a presença de cepas comuns entre gatos e frangos em criação *free-range* através de métodos genotípicos.

Da mesma forma, ratos podem ser carreadores da bactéria de galinhas infectadas para aves susceptíveis à infecção (SAMUEL; BOTZLER; WOBESER, 2007). A análise da virulência de *P. multocida* isolada de diferentes mamíferos em zonas rurais demonstra que as cepas de origem suína são as mais patogênicas para as aves (GLISSON, 2008).

Apesar da *P. multocida* poder causar doença no homem, não existe evidência de que cepas isoladas de aves sejam patogênicas para os humanos ou que estas constituam algum risco para a saúde pública (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009; BACK, 2010). A infecção no homem geralmente está associada a arranhaduras e mordeduras de cães e de gatos (WILSON; HO, 2013).

Nos Estados Unidos, em torno de 300 mil visitas anuais às emergências hospitalares são relacionadas a mordidas e a arranhões de animais domésticos, especialmente envolvendo crianças (WEISS; FRIEDMAN; COBEN, 1998). Nestes casos, *P. multocida* é isolada de praticamente 50% das mordidas caninas e de 75% das lesões provocadas por gatos (FRESHWATER, 2008).

As lesões mais comumente observadas são a celulite, as linfagites e, mais raramente, o desenvolvimento de abscessos e de artrites sépticas (EWERS *et al.*, 2006). Ocasionalmente, *P. multocida* pode estar envolvida em infecções sistêmicas fatais com a ocorrência de meningites e de endocardites, especialmente em pacientes imunodeprimidos (KAWASHIMA *et al.*, 2010; GUILBART *et al.*, 2015). Alguns casos de meningite em humanos, causados por *P. multocida*, relatam o contato direto com animais de companhia, especialmente com superfícies mucosas sem a ocorrência prévia de lesões de pele como causa para o surgimento da doença (PER *et al.*, 2010, GIORDANO *et al.*, 2015).

A pasteurelose em humanos é uma causa relativamente rara de mortalidade, que é provavelmente justificada pelo tratamento profilático de lesões ocasionadas pelas mordidas de animais (CHEAH; CHONG, 2011). Entretanto, as mortes associadas com a

infecção, majoritariamente associada à espécie *multocida*, aumentaram nos últimos anos nos Estados Unidos (WILSON; HO, 2013).

3.4 Patogenia

Apesar do amplo espectro de doenças causadas e do impacto econômico envolvido, o conhecimento da patogenia das pasteureloses é pequeno, especialmente quando comparado com os estudos descritos em outras bactérias Gram-negativas (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Por exemplo, preconiza-se um maior conhecimento do sítio inicial de colonização que precede a disseminação sistêmica e de como a bactéria penetra nas mucosas do trato respiratório e digestivo antes de acessar a circulação sanguínea (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Curiosamente, a vacinação para CA é considerada o nascimento da imunologia (BERCHE, 2012), e mesmo após mais de 125 anos da realização dos famosos trabalhos desenvolvidos por *Louis Pauster*, ainda não se obteve uma vacina ideal para a prevenção desta enfermidade.

A principal razão para esta lacuna é que a análise genética de *P. multocida* avançou somente nos últimos quinze anos. A maioria dos trabalhos conduzidos anteriormente a este período eram estudos descritivos em que a identificação ou a caracterização de genes e de proteínas associadas a um genótipo não eram realizados (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). O primeiro genoma da bactéria totalmente sequenciado ocorreu em 2001 e foi de uma cepa de origem aviária, denominada Pm70 (MAY *et al.*, 2001). A análise do genoma permitiu a identificação de diferentes genes de virulência, como hemaglutininas filamentosas e genes envolvidos no transporte e no metabolismo do ferro (BOYCE *et al.*, 2012). Da mesma forma, trabalhos envolvendo clonagem e sequenciamento da região de biossíntese das cápsulas permitiram a identificação de regiões específicas de cada sorogrupo de *P. multocida* (CHUNG; ZHANG; ADLER, 1998; BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000a).

A bactéria é aparentemente um habitante normal das vias aéreas de animais saudáveis e pode ser mantida na região da orofaringe em hospedeiros imunocompetentes por longos períodos sem causar doença (MUHAIRWA; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000; SAMUEL; BOTZLER; WOBESER, 2007). Contudo, muitos comensais podem tornar-se patógenos, principalmente devido a modificações na patogenicidade do microrganismo (KUBATZKY, 2012). Até o momento, nenhum único fator de virulência ou mecanismo é diretamente

correlacionado com a incidência ou a severidade de CA, mas a variação das condições do ambiente ou do hospedeiro contribui para a ocorrência e para a severidade da doença (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Processos estressantes como a alimentação deficiente, as condições inadequadas de manejo, a sobrecarga fisiológica, a infestação parasitária e as infecções concomitantes são fatores predisponentes ao desenvolvimento da CA (ANDREATTI FILHO, 2007).

Apesar da rota de infecção não estar totalmente esclarecida, algumas evidências apontam que o trato respiratório consiste no principal sítio de entrada da bactéria (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Neste contexto, cepas virulentas de *P. multocida* são capazes de colonizar a mucosa do trato respiratório superior e, posteriormente, infectar os sacos aéreos e os pulmões (RHOADES; RIMLER, 1990). Um achado consistente com a definição do trato respiratório como a principal rota de infecção é a frequente presença de lesões pulmonares em casos clínicos ou após desafios experimentais pela via intratraqueal (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Através de um mecanismo desconhecido, mas possivelmente relacionado à migração em macrófagos do trato respiratório superior, a bactéria pode acessar a circulação sanguínea a partir da mucosa e multiplicar-se em diferentes tecidos, especialmente no fígado e no baço (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

A intensidade e o número de lesões macroscópicas observadas nos casos agudos de CA são variáveis. De acordo com Bojesen *et al.* (2004), as lesões teciduais podem ser causadas pelos granulócitos do hospedeiro infectado, embora as mesmas células limitem a extensão do processo infeccioso. A persistência da bactéria no local de infecção, assim como a migração para outros tecidos e o tempo até a morte, dependem das características da cepa e da resposta imune do hospedeiro (BOYCE *et al.*, 2002; BOYCE *et al.*, 2010; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). A morte está provavelmente associada com uma massiva bacteremia e com o choque septicêmico, ocorrendo lise e consequente liberação de endotoxinas em quantidade suficiente para lesar os tecidos do hospedeiro (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). As petéquias na serosa dos órgãos envolvidos, especialmente do epicárdio, são indicativas de coagulopatias associadas aos casos de endotoxemias (BOYCE *et al.*, 2010). Embora seja geralmente aceito que a CA consiste em uma infecção septicêmica, a bactéria somente pode ser isolada em grande quantidade do sangue das aves em um estágio tardio da infecção (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006).

3.5 Fatores de virulência

A virulência é a capacidade relativa de um patógeno em causar doença (MADIGAN *et al.*, 2010). Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam estes fatores, os quais propiciam a colonização e a ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira (VIEIRA, 2009). De acordo com Wassenaar e Gastra (2001), os genes que codificam tais fatores são divididos em três categorias: os genes de virulência verdadeiros, responsáveis diretos pelos danos celulares provocados, os genes associados à virulência, que regulam ou ativam a expressão da classe anterior, e os genes relacionados à patogênese do microrganismo, que auxiliam na colonização, na invasão e na sobrevivência intracelular durante o processo infeccioso.

Contudo, a definição ou a classificação de uma cepa conforme a sua patogenicidade ainda fica restrita, pois muitos destes genes podem codificar fatores de virulência ainda não comprovados em estudos experimentais (BOYCE *et al.*, 2012). Além disto, nenhum único fator de virulência ou mecanismo é correlacionado com a incidência de CA (DZIVA *et al.*, 2008; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

As principais estruturas associadas à virulência e identificadas em cepas de *P. multocida* são a cápsula e o lipopolissacarídeo (LPS). Entretanto, outros diversos fatores podem ser relacionados à capacidade do agente em infectar um hospedeiro, assim como de sobreviver em um ambiente hostil ou deficiente em nutrientes essenciais (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; BOYCE *et al.*, 2010; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Alguns destes genes de virulência estão presentes em todos os genomas de *P. multocida* que foram totalmente ou parcialmente sequenciados (WILSON; HO, 2013).

Exemplos são os genes que codificam estruturas como fímbrias e adesinas (*ptfA*, *pfhA*) ou proteínas externas de membrana (*ompH*, *oma87*) (CORNEY *et al.* 2007, HATFALUDI *et al.* 2010). Diferentes trabalhos também identificaram e caracterizaram genes que codificam enzimas do metabolismo bacteriano, como sialidases (*nanH*, *nanB*), dismutases (*sodA*, *sodC*), proteínas associadas ao transporte e ao metabolismo do ferro (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*), além da exotoxina dermonecrótica (*toxA*) (MIZAN *et al.* 2000; COX *et al.* 2003; EWERS *et al.*, 2006; GUENTHER *et al.*, 2008; BETHE *et al.*, 2009). 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 várias enzimas hidrolíticas, como sialidasas, que facilitam a aquisição de nutrientes e a disseminação no organismo (WILSON; HO, 2013). Em 2011, protocolos de multiplex-PCR foram desenvolvidos e padronizados no CDPA para a detecção de todos os genes de virulência anteriormente citados (FURIAN, 2011).

Outros genes importantes em *P. multocida* que estão associados a diferentes mecanismos durante o processo infeccioso são *ompA*, *plpB*, *fur*, *hsf-1*, *tadD* e *pmHAS*. Assim como observado em outras bactérias Gram-negativas, a proteína de membrana externa OmpA (*Outer Membrane Protein* - OMP) também é um constituinte das cepas de *P. multocida* (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). A interação da região C-terminal de OmpA na membrana plasmática promove a ligação e a estabilização do envelope celular da bactéria ao peptidoglicano (NIKAIDO, 2003). Apesar da função prioritariamente estrutural, OmpA também é considerada uma porina, pois permite a difusão lenta de íons e de moléculas hidrofílicas através da membrana externa (HATFALUDI *et al.*, 2010). Diferentes trabalhos também destacam o papel de OmpA na adesão de *P. multocida* à matriz extracelular e na formação de biofilmes (DABO *et al.*, 2003; HATFALUDI *et al.*, 2010). Muitas destas propriedades são relacionadas à estrutura monomérica da proteína, particularmente a quatro pequenas alças que emanam da proteína para o ambiente externo (SMITH *et al.*, 2007).

As OMPs também são consideradas fatores imunogênicos conservados (KUBATZKY, 2012). Assim como ocorre em pesquisas que avaliam o papel da proteína OmpH como um epítipo específico para a formulação de vacinas contra CA (LUO *et al.*, 1999; LEE; KIM; KWON, 2007), estudos de análise proteômica também identificaram a propriedade imunogênica de OmpA (AL-HASANI *et al.*, 2007). Em 2008, Dabo e colaboradores promoveram a imunização de camundongos com uma vacina recombinante e observaram uma alta correlação com a produção de imunoglobulinas da subclasse IgG1 após o desafio dos animais. Assim como é observado com a proteína OmpH, a estrutura de OmpA também apresenta considerável heterogeneidade que pode ser utilizada para a classificação de variantes entre diferentes hospedeiros (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004).

A identificação de novos imunógenos através da vacinologia reversa pode consistir em um primeiro estágio para o desenvolvimento de uma vacina recombinante para CA (AL-HASANI *et al.*, 2007). Em 2004, outra proteína denominada PlpB foi identificada na membrana externa do microrganismo (TABATABAI; ZEHR, 2004). Esta lipoproteína está envolvida no transporte de metionina pela bactéria, tanto em

camundongos quanto em aves, e foi inicialmente descrita como um antígeno que conferiria proteção cruzada ao desafio por *P. multocida* (TABATABAI; ZEHR, 2004; HATFALUDI *et al.*, 2010). Entretanto, vacinas recombinantes de PlpB não demonstraram ser eficientes na proteção de camundongos ou de galinhas desafiadas, apesar de estimular uma resposta imune humoral (WU *et al.*, 2007; CHOMNAWANG *et al.*, 2009). A proteína PlpB está envolvida na virulência de *P. multocida*, pois cepas mutantes que não expressam o gene são avirulentas em galinhas e em camundongos (HATFALUDI *et al.*, 2010).

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência das bactérias, pois participa de inúmeros processos biológicos (MADIGAN *et al.*, 2010). Logo, a habilidade dos microrganismos patogênicos em obter este elemento consiste em uma característica primordial para definir o seu sucesso durante o processo infeccioso (RATLEDGE; DOVER, 2000). Como é comum em outras bactérias, *P. multocida* também desenvolveu mecanismos básicos para adquiri-lo. Esta aquisição pode ser feita através de agentes quelantes, sideróforos, que captam o ferro de hidróxidos férricos, ou através de receptores, a partir de proteínas do hospedeiro (KREWULAK; VOGEL, 2008).

A análise do genoma da cepa Pm70 indica que pelo menos 53 genes codificam proteínas associadas com a aquisição do ferro (MAY *et al.*, 2001), sendo que a maior parte delas ainda não foi caracterizada (BOYCE *et al.*, 2012). A grande quantidade de genes descritos sugere que a bactéria apresenta um número redundante de proteínas associadas para uma mesma função no metabolismo do ferro (BOYCE *et al.*, 2012). Desta forma, trabalhos com único mutante alvo não resultam na atenuação das cepas (BOSCH *et al.*, 2002; COX *et al.*, 2003).

Os genes que estão envolvidos em mecanismos redundantes são expressos de acordo com a concentração de ferro na célula bacteriana, provavelmente sob a influência de um regulador comum ao processo (RATLEDGE; DOVER, 2000). Diferentes estudos sugerem que a proteína Fur seja um dos principais reguladores da captação do elemento entre as bactérias Gram-negativas (BOSCH *et al.*, 2002; PAUSTIAN *et al.*, 2002). Da mesma forma, a expressão da proteína de membrana externa OmpH também é regulada por Fur (BOSCH *et al.*, 2001). Muitas proteínas relacionadas à aquisição do ferro foram testadas como potenciais antígenos na formulação de vacinas, contudo não resultaram na proteção dos animais (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

A adesão à célula hospedeira consiste em um pré-requisito para o processo infeccioso (HATFALUDI *et al.*, 2010). Além disto, muitos genes que codificam adesinas são comuns entre espécies bacterianas distintas. Por exemplo, os genes *ptfA*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf1* e *hsf2* presentes no genoma de *P. multocida* também foram identificados em outros microrganismos (MAY *et al.*, 2001; REGGIE, 2001).

Os genes *hsf-1* e *tadD* classificados, respectivamente, como adesina de autotransporte e de aderência não-específica, foram pesquisados em estudos de análise do perfil genético em cepas de *P. multocida* isoladas de suínos e de bovinos (TANG *et al.*, 2009; KATSUDA *et al.*, 2013; MORAES *et al.*, 2014). Regiões homólogas do locus de biossíntese do gene *tad* estão presentes em outros membros da família *Pasteurellaceae* e em outras bactérias Gram-negativas onde apresentam papel fundamental na colonização e na formação de biofilmes (TOMICH; PLANET; FIGURSKI, 2007).

A proteína PmHAS (*Hyaluronan Synthase*) também é uma mediadora da adesão à célula hospedeira (PRUIMBOOM; RIMLER; ACKERMANN, 1999). Mesmo que a sequência de aminoácidos de PmHAS não seja similar à enzima PmHS1 (*Heparosan Synthase*), a qual é responsável pela transferência de monossacarídeos para a formação de heparina, ambas apresentam a habilidade de utilizar a mesma fonte precursora de carboidratos (KANE; WHITE; DeANGELIS, 2006). A cápsula do sorogrupo A de cepas aviárias é constituída principalmente por ácido hialurônico, um polímero formado por unidades alternadas dos ácidos D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000b). A enzima PmHAS é uma glicosiltransferase de dupla ação, isto é, a enzima realiza a adição de ambos os monômeros anteriores para a formação do polímero (DeANGELIS *et al.*, 1998).

3.6 Cápsula

Além de serem considerados os principais fatores de virulência da bactéria, a cápsula e o LPS são utilizados como base para os sistemas de classificação de *P. multocida* (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). As cepas são classificadas em cinco tipos ou sorogrupos (A, B, D, E, F), de acordo com a presença dos antígenos capsulares (CARTER, 1955) e em 16 sorovares, conforme a distribuição dos antígenos somáticos (HEDDLESTON; GALLAGHER; REBERS, 1972). Assim como observado em algumas bactérias Gram-negativas como, por exemplo, *Campylobacter jejuni*, o LPS de

P. multocida não apresenta o antígeno O. Desta forma, a classificação de praticamente todos os sorovares da bactéria é baseada na variação da estrutura externa da região do *core* (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012; HARPER *et al.*, 2015). A combinação do sorogrupo A de *P. multocida* com os antígenos somáticos 1-3 ou 3-4 representa a maioria das cepas isoladas de surtos de CA (CHRISTENSEN; BOJESSEN; BISGAARD, 2008), como demonstram pesquisas recentes desenvolvidas em vários países (EWERS *et al.*, 2006; SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; ARUMUGAM *et al.*, 2011; MOHAMED *et al.*, 2012).

Todas as cápsulas são formadas por polímeros de carboidratos. A cápsula do sorogrupo A é constituída por um polímero formado por unidades alternadas dos ácidos D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Enquanto que as cápsulas do tipo D e F são compostas por glicosaminoglicanos denominados heparina e condroitina, respectivamente (DeANGELIS *et al.*, 2002; HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Apesar de serem complexos de carboidratos semelhantes ao tipo A, estes sorogrupos apresentam sítios distintos de hidrólise quando clivados por enzimas específicas (GLISSON, 2008). As cápsulas dos sorogrupos B e E não apresentam análises químicas detalhadas (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012).

A organização genética do *locus* de biossíntese para os cinco sorogrupos foi determinada nos últimos anos e revela uma apresentação similar para as regiões de biossíntese capsular do grupo III, também descrita em outras bactérias Gram-negativas (CHUNG; ZHANG; ADLER, 1998; BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000b). O *locus* apresenta três regiões, sendo que as regiões 1 e 3 são compostas por genes altamente conservados entre os sorogrupos (BOYCE *et al.*, 2010). Somente a porção 2 contém genes que traduzem enzimas responsáveis pela adição de carboidratos específicos para cada tipo capsular (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Apesar da diversidade de manifestações clínicas observadas e de hospedeiros associados aos tipos capsulares, os cinco sorogrupos parecem ser fortemente relacionados geneticamente (CHRISTENSEN *et al.*, 2005).

O local do genoma responsável pela biossíntese da cápsula do tipo A é formado por 11 sequências abertas de leitura (*Open Reading Frame* - ORF). A primeira região é responsável pela tradução de proteínas envolvidas no transporte dos polissacarídeos da cápsula para a superfície e a terceira envolve proteínas que são similares às que estão relacionados à substituição de fosfolípidos do ácido hialurônico (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000b). A segunda e mais importante região é constituída por cinco genes

(*hyaABCDE*) envolvidos na tradução de enzimas que sintetizam monômeros ativos do açúcar e que atuam como polimerases. Os genes *hyaA* e *hyaD* sintetizam enzimas semelhantes às glicosiltransferases e cada um deles é responsável pela adição de um monômero de açúcar ativado para a formação do polissacarídeo (CHUNG; ZHANG; ADLER, 1998). Da mesma forma, a sequência nucleotídica da região de biossíntese da cápsula do tipo B apresenta 15 ORFs, também divididas em três regiões, que codificam proteínas com funções similares às daquelas da cápsula do tipo A (BOYCE *et al.*, 2010).

Entretanto, os mecanismos responsáveis pela regulação da biossíntese capsular só foram mais claramente esclarecidos com a recente descoberta do gene regulador *fis*, essencial para a transcrição de todas as regiões do *locus* de biossíntese da cápsula do tipo A (STEEN *et al.*, 2010; HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). A mutação pontual do gene *fis* resulta em uma amostra acapsular e na menor expressão de outros 30 genes, incluindo-se o gene *pfhb2*, codificador de uma hemaglutinina filamentosa importante no processo de infecção do hospedeiro (STEEN *et al.*, 2010). A quantidade do polissacarídeo capsular produzida pode variar de acordo com as condições nutricionais e ambientais em que a bactéria encontra-se inserida. Por exemplo, o nível de expressão dos genes capsulares é reduzido quando a bactéria está em contato com determinados antimicrobianos e na presença de baixa concentração de ferro. (JACQUES *et al.* 1994; MELNIKOW *et al.*, 2008). Assim, sugere-se que a ação bacteriostática resulte na supressão da expressão de genes de virulência de *P. multocida* (BOYCE *et al.*, 2012).

A cápsula apresenta importante papel na interação com o organismo infectado e em mecanismos que eludem a resposta imune do hospedeiro. Contudo, é difícil estabelecer conclusões definitivas com os primeiros trabalhos que empregavam mutantes acapsulares espontâneos, pois a utilização de amostras isogênicas neste período não estava disponível, e a natureza das mudanças genéticas não poderia ser definida (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Além disto, Watt *et al.* (2003) verificaram a possibilidade de reversão de amostras inicialmente não capsuladas para capsuladas quando inoculadas em camundongos. Por outro lado, mutantes geneticamente definidos não são capazes de sintetizar ou exportar os carboidratos formados para a superfície. Exemplos são os trabalhos desenvolvidos por Chung *et al.* (2001) que construíram um mutante acapsular da amostra X-73 e de Boyce e Adler (2000) que elaboraram um mutante da amostra M1404 do sorogrupo B. Em ambos os casos, as cepas passaram a ser não letais em camundongos, assim como avirulentas em galinhas.

Os polissacarídeos capsulares são glicosaminoglicanos idênticos aos componentes da matriz celular das células eucarióticas, exceto que a heparina e que a condroitina presentes nas cápsulas do tipo D e F não são sulfatadas. Logo, estas moléculas podem ser reconhecidas como componentes das células hospedeiras infectadas, assim não ocorrendo formação de resposta imune (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; BOYCE *et al.*, 2010; CRESS *et al.*, 2014). Algumas funções atribuídas à cápsula e ao conseqüente aumento da patogenicidade são a resistência à dessecação, a maior aderência a tipos celulares específicos, a atividade antifagocitária e a interação com o sistema complemento do hospedeiro (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000b).

Entretanto, o papel da cápsula na adesão é conflitante entre diferentes trabalhos (JACQUES *et al.*, 1993; PRUIMBOOM *et al.*, 1996). Torna-se difícil a definição deste papel devido à semelhança dos polímeros das diferentes cápsulas com os polímeros das células eucarióticas (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012).

3.6.1 Métodos de tipificação capsular

A classificação dos sorogrupos de *P. multocida* é considerada fundamental, pois a relação de um determinado tipo capsular com doenças específicas é reconhecida (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). Sugere-se uma possível inter-relação entre o tipo capsular, a patogenia e a predisposição do hospedeiro a um sorogrupo em particular (CHUNG; ZHANG; ADLER, 1998). Contudo, a base celular e molecular para esta associação ainda não está esclarecida (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012).

A maioria dos surtos de CA está relacionada com cepas do tipo A (WOO; KIM, 2006; DZIVA *et al.*, 2008), enquanto que os casos de septicemia hemorrágica estão associados com os tipos E ou B e, de rinite atrófica em suínos, com o sorogrupo D (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012). A prevalência dos sorogrupos de *P. multocida* pode variar consideravelmente de acordo com a distribuição geográfica e ao longo do tempo em uma determinada região (KEHRENBERG *et al.*, 2001; JAGLIC *et al.*, 2005). Um exemplo é o aumento dos casos de pneumonia em suínos causados pelo tipo capsular D que antigamente eram relacionados ao sorogrupo A (BOROWSKI *et al.*, 2007) e de casos de pasteurelose em coelhos causados pelo sorogrupo B (KATOCH *et al.*, 2015). Da mesma forma, os tipos capsulares B e D também são identificados em isolados de CA, em adição aos sorogrupos A e F (GLISSON, 2008).

A tipificação baseada em um teste de hemaglutinação indireta (HAI) desenvolvido por Carter em 1955, e modificado por Sawada, Rimier e Rhoades em 1982, permite a identificação dos cinco tipos capsulares de *P. multocida* e consiste em um esquema padrão adotado mundialmente. Entretanto, a identificação dos sorogrupos através desta técnica caiu em desuso, em parte, porque muitos isolados capsulados podem não aglutinar com antissoros homólogos (ARUMUGAM *et al.*, 2011). Além disto, o teste de HAI depende da presença do antígeno capsular, o qual pode ser perdido após sucessivos cultivos em laboratório (DZIVA *et al.*, 2008).

Certos sorotipos de *P. multocida* exibem características distintas que podem ser exploradas para uma rápida identificação por métodos fenotípicos não sorológicos. Por exemplo, cepas do sorotipo B:2 isoladas em casos de septicemia hemorrágica produzem hialuronidase, a qual despolimeriza o ácido hialurônico presente em cepas encapsuladas de *Streptococcus* spp. (CARTER; CHENGAPPA, 1991 *apud* DZIVA *et al.*, 2008). De maneira semelhante, cepas do tipo A podem ser facilmente identificadas utilizando-se uma semente cruzada com uma cepa de *Staphylococcus* spp. que sintetize a mesma enzima (CARTER; RUNDELL, 1975). Por último, os isolados do tipo D produzem uma floculação em caldo de crescimento na presença de uma solução de acriflavina em um mecanismo com bases desconhecidas (CARTER; SUBRINTO, 1973).

Outros testes diagnósticos presuntivos, como a utilização de microscopia com luz oblíqua, são sugeridos em casos suspeitos de CA. Colônias ricamente encapsuladas, geralmente isoladas em casos clínicos, apresentam forte iridescência, enquanto colônias provenientes de passagens sucessivas em laboratório apresentam coloração azulada ou baixa iridescência (HEDDLESTON; WATKO; REBERS, 1964; GLISSON, 2008). Outra possível relação entre a virulência de uma cepa de *P. multocida* e a presença da cápsula consiste na avaliação da presença e da espessura do polímero através do emprego de microscopia eletrônica (BORRATHYBAY *et al.*, 2003).

A elucidação da base genética da biossíntese capsular proporcionou o desenvolvimento de métodos moleculares de identificação (DeANGELIS *et al.*, 2002; DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; BOYCE *et al.*, 2010). Após o desenvolvimento de um protocolo de multiplex-PCR por Townsend *et al.* (2001), o método molecular passou a ser empregado em diversos trabalhos (JAGLIC *et al.*, 2005; LEOTTA *et al.*, 2006a; JABBARI; ESMAELZADEH; MOAZENI JULA, 2006; SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007; SHIVACHANDRA; KUMAR; CHAUDHURI, 2008; BETHE *et al.*, 2009; FURIAN,

2011; ESPINOSA; BAEZ; VICHI, 2012; KATOCH *et al.*, 2015). Esta técnica permite a identificação da cepa quando não é possível realizar a definição do tipo capsular pelo teste fenotípico, por exemplo, devido a mutações no *locus* de biossíntese da cápsula (BOYCE *et al.*, 2010).

A utilização dos métodos de controle das pasteureloses, tais como o emprego de antimicrobianos ou de vacinas autógenas requerem estudos de identificação capsular em cada área geográfica. Entretanto, a sorotipagem não é realizada rotineiramente, devido à falta de antissoros comerciais (TOWNSEND *et al.*, 2001). A incompatibilidade da composição de vacinas com os sorotipos capsulares comuns à determinada região e o desconhecimento da situação epidemiológica local podem ser uma das causas para as falhas vacinais (KEHRENBURG *et al.*, 2001).

3.7 Tipificação molecular dos isolados e PCR-RFLP

Os métodos de tipificação são baseados na teoria de que os isolados de *P. multocida* que apresentam uma fonte comum de isolamento compartilham propriedades que os diferenciam de cepas de outras origens (BLACKALL; MIFLIN, 2000). Os métodos são utilizados para a caracterização detalhada sobre a diversidade das cepas e em estudos de patogenia e de epidemiologia (BOERLIN *et al.*, 2000; KARDOS; KISS, 2005). A tipificação molecular pode ser utilizada para a identificação da fonte de infecção em casos de surtos de doenças (BRUISTEN; SCHOULS, 2010).

Estes testes são geralmente avaliados quanto à tipabilidade, à reprodutibilidade, ao poder de discriminação e quanto à facilidade de uso (ARBEIT, 1995). Se o poder discriminatório for adequado, o método pode ser utilizado para a coleta de dados sobre certos membros da população bacteriana e para relacioná-los com a doença e com os hospedeiros (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). Contudo, a relação filogenética predita através da comparação do polimorfismo de nucleotídeos em posições conservadas dos nove genomas de *P. multocida* sequenciados demonstra que não há correlação das relações filogenéticas das cepas conforme o país de isolamento, o sorogrupo, a doença e a predileção por um determinado hospedeiro (BOYCE *et al.*, 2012).

Os métodos moleculares apresentam maior destaque na tipificação de *P. multocida* devido às limitações inerentes aos testes de biotipificação através da fermentação de carboidratos (MUHAIRWA *et al.*, 2001) e através dos testes

sorológicos (CARTER, 1955; CARTER, 1961). Além disto, geralmente a biotificação e os métodos sorológicos não apresentam poder discriminatório suficiente para a análise de surtos distintos causados por um mesmo clone de *P. multocida* (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). Também a tipificação molecular dos sorogrupos de *P. multocida* representa uma ferramenta útil na comparação de cepas, especialmente de origens distintas. Entretanto, ela se torna ineficaz na diferenciação e na caracterização dos isolados em geral (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004).

Atualmente, diferentes métodos de genotipagem são empregados em estudos epidemiológicos (DZIVA *et al.*, 2008). A análise de enzima de restrição (*Restriction endonuclease analysis* - REA), a ribotipagem, a análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - RAPD), a sequência palindrômica repetitiva (*Repetitive Extragenic Palindromic* - REP-PCR), a análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR-RFLP), a eletroforese enzimática multilocus (*Multilocus Enzyme Electrophoresis* - MLEE) e a tipificação por sequenciamento de multilocus (*Multilocus Sequence Typing* - MLST) são as técnicas mais utilizadas (PEDERSEN *et al.*, 2003; DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; DZIVA *et al.*, 2004; JABBARI; ESMAELIZADEH, 2005; SHIVACHANDRA; KUMAR; CHAUDHURI, 2008; SINGH *et al.*, 2013; PETERSEN *et al.*, 2014). Entretanto, nenhuma das técnicas citadas é considerada um padrão ouro para a tipificação de *P. multocida* (LEOTTA *et al.*, 2006a).

Estas técnicas são fundamentais na discriminação de surtos de CA, pois as cepas de *P. multocida* de origem aviária apresentam grande diversidade molecular, constatada por inúmeros estudos (GUNAWARDANA; TOWNSEND; FROST, 2000; PETERSEN *et al.*, 2001; DAVIES; MACCORQUODALE; CAFFREY, 2003b). Por exemplo, 56 tipos eletroforéticos foram identificados entre 81 isolados australianos de CA através da técnica de MLEE (BLACKALL *et al.*, 1998). Em 2000, Gunawardana, Townsend e Frost analisaram 73 cepas australianas e 22 vietnamitas de *P. multocida* de origem aviária através de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE) com alto poder de discriminação. Outras pesquisas com cepas isoladas de hospedeiros distintos e baseadas especialmente no trabalho de Gunawardana, Townsend e Frost (2000) foram realizadas nos últimos anos (JAGLIC *et al.*, 2005; JAGLIC *et al.*, 2006; LEOTTA *et al.*, 2006b; ANTONY *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2012).

Da mesma forma, o uso de REA e da ribotipagem têm provido consideráveis informações sobre as características genômicas de *P. multocida* (WEISER *et al.*, 2003; DZIVA *et al.*, 2004). Através do emprego da ribotipagem, Christensen, Dietz e Bisgaard (1998) observaram que os surtos ocorridos em aves aquáticas e domésticas na Dinamarca em 1996 foram causados pelo mesmo clone de *P. multocida*. Contudo, tanto a REA quanto a ribotipagem são técnicas laboriosas (JABBARI; ESMAELIZADEH, 2005).

Assim, entre os métodos moleculares disponíveis, os testes de caracterização genômica relacionados ao uso de PCR são mais rápidos, viáveis e precisos (JABBARI; ESMAELIZADEH, 2005). Um exemplo é a técnica de PCR-RFLP, na qual fragmentos amplificados por PCR são submetidos à digestão com uma ou mais endonucleases de restrição, seguida de eletroforese em gel de agarose (GANDRA *et al.*, 2008). A RFLP é utilizada na verificação de polimorfismos a partir da identificação da alteração do padrão de clivagem associado a mutações pontuais em sítios específicos de restrição (PASSAGLIA; ZAHA, 2003). Pesquisas baseadas nas estruturas do gene *ompH* e do lipopolissacarídeo são alguns exemplos de trabalhos que utilizaram a técnica de PCR-RFLP em *P. multocida* (BOROWSKI, 2001; JABBARI; ESMAELIZADEH, 2005; TSAI *et al.*, 2011; SELLYEI; IVANICS; MAGYAR, 2013; GHANIZADEH *et al.*, 2015).

Entre 20 a 30% dos genes presentes em uma bactéria codificam OMPs que, em parte, estão sujeitas à pressão seletiva e à considerável heterogeneidade na massa molecular e na sequência nucleotídica que podem ser utilizadas para avaliar a diversidade e as relações epidemiológicas das cepas (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004). A proteína OmpH consiste na principal OMP presente no envelope de *P. multocida* e o alinhamento genético dos 16 sorotipos existentes demonstra variação no comprimento e na sequência nucleotídica restrita a duas regiões que codificam grandes alças presentes na estrutura secundária da proteína (HATFALUDI *et al.*, 2010).

Outra importante porina é a OmpA, contudo esta proteína apresenta menor heterogeneidade do que OmpH (DAVIES; MACCORQUODALE; CAFFREY, 2003b). Em 2015, Voudigou e colaboradores observaram a presença de três diferentes perfis entre cepas de bovinos e de suínos, na Grécia, utilizando a mesma enzima *DraI* e outra região do gene *ompA* amplificada. As proteínas inseridas na membrana externa de bactérias Gram-negativas apresentam funções diversas e essenciais para a célula bacteriana, como a interação do patógeno com o ambiente ou com os tecidos do

hospedeiro, além de promoverem o transporte de moléculas (HATFALUDI *et al.*, 2010).

3.8 Resistência antimicrobiana

A resistência aos antimicrobianos consiste na capacidade adquirida por um organismo de resistir aos efeitos de um fármaco ao qual é normalmente suscetível. Os microrganismos produtores de antibióticos desenvolvem mecanismos de resistência para neutralizá-los, fato que provavelmente justifique a origem de genes codificadores de resistência através da evolução (MADIGAN *et al.*, 2010).

A evolução é o resultado de duas essenciais forças: a variabilidade e a seleção. Enquanto a primeira fornece o material ou substrato necessário à evolução, a segunda consiste no processo de adaptação de uma inovação genética às necessidades do equilíbrio bacteriano no ambiente. Conseqüentemente, a presença de uma estirpe bacteriana hipermutável ou o emprego indiscriminado de um antimicrobiano resultam em uma maior resistência (BAQUERO; CANTÓN, 2009, TANG *et al.*, 2009). Entretanto, a maioria dos determinantes da resistência não é relacionada a mutações simples, mas envolve vários genes e mecanismos complexos, inclusive a transferência lateral de genes (BAQUERO; CANTÓN, 2009).

Em comparação com agentes patogênicos específicos de seres humanos, os padrões de resistência antimicrobiana de patógenos exclusivamente isolados de animais de produção apresentam um número restrito de dados disponíveis (WASSENAAR; SILLEY, 2008). Além disto, a vigilância de algumas bactérias, como *P. multocida*, é menor em comparação com a vigilância da resistência antimicrobiana de enterobactérias. Contudo, o conhecimento e o controle da resistência em microrganismos geralmente comensais é importante, pois o emprego de antimicrobianos pode resultar na seleção de cepas resistentes na flora do sistema respiratório, aumentando suas prevalências (BABETSA *et al.*, 2012). Os mecanismos de resistência bacteriana estão baseados na redução da permeabilidade do antimicrobiano, na inativação ou na alteração do alvo do fármaco, no desenvolvimento de uma via bioquímica resistente ou no efluxo (MADIGAN *et al.*, 2010).

Diversos estudos citam que o uso imprudente, como, por exemplo, em doses subterapêuticas aumentam o risco de seleção bacteriana e de disseminação de genes de resistência (WALSH; FANNING, 2008; TANG *et al.*, 2009). As bactérias são

particularmente eficientes em tais mecanismos, não somente pela capacidade que apresentam em se multiplicar, mas também por transferirem genes normalmente situados em elementos transmissíveis, como plasmídeos, integrons ou transposons (GÓRNIAK; SPINOSA, 2007). A maioria dos genes de resistência antimicrobiana em *P. multocida* está associada com pequenos plasmídeos ou com transposons (KEHRENBURG *et al.*, 2001).

No estudo desenvolvido por Wright, Strugnell e Hodgson (1997), a presença de quatro plasmídeos com tamanhos variáveis entre 1,5 e 5,4 Kb foi identificada em cepas de *P. multocida* do tipo D isoladas de suínos com rinite atrófica. O maior destes plasmídeos (pIGI) pode replicar tanto em cepas de *P. multocida* quanto de *Escherichia coli* e carrega genes de resistência tanto às sulfonamidas, quanto à estreptomicina (WRIGHT; STRUGNELLE; HODGSON, 1997). Neste sentido, Kehrenberg *et al.*, (2001) identificaram um plasmídeo (pVM111) de uma cepa de um caso de CA carregando genes de resistência às sulfonamidas, à estreptomicina e à tetraciclina (KEHRENBURG; THAM; SCHWARZ, 2003).

Em 2009, San Millan e colaboradores demonstraram que algumas cepas de *P. multocida* carregam múltiplos plasmídeos, cada um deles com um ou mais genes de resistência antimicrobiana. Todos os plasmídeos apresentam alta mobilidade e regiões denominadas *oriv* que são responsáveis pela replicação e pelo controle do número de cópias geradas (SAN MILLAN *et al.*, 2009). Embora as regiões *oriv* sejam altamente conservadas entre os plasmídeos, elas não são idênticas e pressupõe-se que tais diferenças são suficientes para permitir a coexistência de pelo menos três plasmídeos na mesma célula (SAN MILLAN *et al.*, 2009).

O controle de CA é primordialmente assegurado através da adoção de boas práticas de manejo e do tratamento com agentes antimicrobianos (MOHAMED *et al.*, 2012). Devido ao aumento da resistência de *P. multocida* em alguns casos clínicos, um número concentrado de fármacos geralmente é recomendado para o tratamento, incluindo-se sulfonamidas, tetraciclina e estreptomicinas (BABETSA *et al.*, 2012).

Entre os antimicrobianos utilizados em medicina veterinária, as tetraciclina são empregadas em dois terços dos casos (KEHRENBURG *et al.*, 2001), o que geralmente resulta em um alto percentual de cepas de *P. multocida* resistentes a estas substâncias (HUANG; LIN; WU, 2009; BABETSA *et al.*, 2012). Os genes de resistência à tetraciclina das três diferentes classes de hibridização (H, B e M) já foram identificados entre espécies de *Pasteurella* (KEHRENBURG *et al.*, 2001). Enquanto o gene *tet* (M) é

detectado no DNA cromossomal, os genes *tet* (B) e *tet* (H) são associados com elementos transponíveis (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006).

A resistência genética de *P. multocida* aos beta-lactâmicos é frequentemente mediada por pequenos plasmídeos de 4,1 ou 4,4 Kb que apresentam o gene *bla_{rob1}*, o qual codifica uma enzima β -lactamase que media a resistência às penicilinas e às cefalosporinas de primeira geração (LIVRELLI; PEDUZZI; JOLY, 1991 *apud* KEHRENBURG *et al.*, 2001). Os estudos moleculares sobre a resistência aos aminoglicosídeos em *Pasteurella* spp. concentram-se na análise da estreptomicina, um dos fármacos indicados nos casos de CA. Como exemplo, o gene *strA*, predominantemente associado com plasmídeos com menos de 10 Kb em isolados de perus, bovinos e suínos, codifica uma aminoglicosidase fosforotransferase que inativa a estreptomicina (KEHRENBURG *et al.*, 2001). A resistência às sulfonamidas é mediada pelo gene *suII* e a resistência ao cloranfenicol pelo genes *cat* - *catAI*-*catAIII* - que codificam a enzima acetiltransferase cloranfenicol (YAMAMOTO; SAKANO; SHIMIZU, 1990).

Apesar das cepas de *P. multocida* demonstrarem sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados (HUANG; LIN; WU, 2009; SELLYEI; WEHMANN; MAGYAR, 2009; TANG *et al.*, 2009; RIGOBELLO *et al.*, 2013), as taxas de multirresistência têm aumentado nos últimos anos, especialmente associadas à tetraciclina, às quinolonas de primeira geração e aos aminoglicosídeos. Na literatura, observa-se uma grande variação dos perfis de susceptibilidade antimicrobiana entre as cepas de *P. multocida*. Como exemplo, Espinosa, Baez e Vichi (2012) relataram que 100% dos isolados provenientes de suínos com alterações respiratórias foram resistentes à amoxicilina. Por outro lado, Habrun e colaboradores (2010) identificaram mais de 90% das cepas, também de origem suína, sensíveis ao mesmo antimicrobiano.

3.8.1 Testes de sensibilidade antimicrobiana

A existência de bactérias patogênicas resistentes a múltiplos antimicrobianos de uso humano ou veterinário consiste em uma preocupação mundial para os diferentes organismos relacionados, como a OIE (*World Organization for Animal Health*), a FAO (*Food and Agriculture Organization*) e a WHO (*World Health Organization*). Devido a esta situação, os veterinários clínicos são dependentes das informações obtidas através dos testes de susceptibilidade *in vitro* para a escolha do antimicrobiano a ser empregado

(JORGENSEN; FERRARO, 2009; OIE, 2012). O sucesso terapêutico é dependente da realização dos testes *in vitro*, pois a susceptibilidade das cepas de *P. multocida* aos antimicrobianos tende a variar (GLISSON, 2008; HUANG; LIN; WU, 2009; JONES *et al.*, 2013).

O primeiro teste de sensibilidade antimicrobiana foi descrito em 1924 por Fleming e, em anos seguintes, procedimentos baseados no princípio da inibição do crescimento bacteriano através da difusão dos antimicrobianos em ágar foram publicados (PIDDOCK, 1990). Contudo, a falta de padronização destes testes foi reconhecida nas décadas seguintes, e Bauer *et al.* (1966) descreveram procedimentos padrões para a performance dos testes de disco-difusão.

Atualmente, a padronização das metodologias é imprescindível para a validação dos resultados e para que os dados obtidos em laboratórios de diferentes nações possam ser comparados (OIE, 2012). Além da metodologia utilizada, as espécies bacterianas monitoradas, os agentes antimicrobianos testados e os critérios de interpretação dos resultados podem variar entre os países, dificultando a comparação dos resultados (MIGURA *et al.*, 2014).

Estes testes são divididos em métodos qualitativos e quantitativos. Os exemplos mais empregados em cada categoria são os métodos de disco-difusão e de microdiluição em caldo, respectivamente. O primeiro destaca-se pela simplicidade do procedimento, pelo baixo custo e pela maior flexibilidade para a seleção dos discos com os princípios ativos a serem testados. Por outro lado, o teste de microdiluição em caldo apresenta maior reprodutibilidade e, especialmente, gera um resultado quantitativo através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (JORGENSEN; FERRARO, 2009; RUBIN, 2013).

De acordo com o Manual Laboratorial de Metodologias para Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana da OIE, o método de disco-difusão pode ser utilizado como uma ferramenta de *screening* para um grande número de isolados, os quais podem ser posteriormente analisados através de testes quantitativos (OIE, 2012). Diversos trabalhos disponíveis na literatura utilizam ambas as técnicas para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *P. multocida* isoladas de diferentes hospedeiros (HUANG; LIN; WU, 2009; TANG *et al.*, 2009; SELLYEI; WEHMANN; MAGYAR, 2009; HABRUN *et al.*, 2010; KALHORO *et al.*, 2010; ESPINOSA; BAEZ; VICHI, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012; MOHAMED *et al.*, 2012).

O valor da CIM, expresso em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$), consiste na menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. A CIM obtida através dos testes de diluição determina qual a concentração do agente antimicrobiano necessário no sítio da infecção para inibir o organismo infectante (CLSI, 2013a). Os índices CIM₅₀ e CIM₉₀ referem-se, respectivamente, aos valores em que 50% ou 90% do crescimento dos isolados são inibidos (HUANG; LIN; WU, 2009).

Os critérios de interpretação dos resultados elaborados pelo CLSI (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*), organismo de referência na área, são estabelecidos conforme a distribuição dos valores de CIM e do diâmetro dos halos de inibição, conforme os parâmetros da farmacocinética e da farmacodinâmica dos antimicrobianos testados e de acordo com os resultados de estudos clínicos (JORGENSEN; FERRARO, 2009; CLSI, 2013a).

Contudo, os valores da CIM podem apresentar diferentes interpretações (WASSENAAR; SILLEY, 2008). Primeiramente, indica um limiar acima do qual uma determinada bactéria não sobrevive ou se multiplica *in vitro* ou para qual o tratamento clínico seja eficiente. Além disto, o padrão de distribuição da CIM também permite a identificação de duas ou mais populações de microrganismos diferenciadas pela presença ou ausência de fatores de resistência (SIMJEE *et al.*, 2008 *apud* WASSENAAR; SILLEY, 2008). Esta visão epidemiológica muitas vezes resulta na seleção de um valor de CIM que distingue uma população susceptível - tipo selvagem - de uma população menos susceptível. O corte epidemiológico é geralmente inferior ao ponto de interrupção clínica, uma vez que o primeiro não tem que necessariamente prever probabilidade de sucesso do tratamento ou mesmo a falha clínica (BYWATER; SILLEY; SIMJEE, 2006).

Assim como critérios uniformes de interpretação dos testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* são necessários, o uso de um conceito padrão para bactérias resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos é fundamental para a comparação dos dados de vigilância (MAGIORAKOS *et al.*, 2011). Em termos literais, MDR (*Multidrug Resistant*) significa a resistência a múltiplos antimicrobianos, contudo não há definições padronizadas acordadas pela comunidade médica (SCHWARZ *et al.*, 2010; MAGIORAKOS *et al.*, 2011). A definição mais utilizada para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é a resistência a três ou mais classes de drogas a partir dos resultados obtidos em testes *in vitro* (JEONG *et al.*, 2007; KALLEN *et al.*, 2010; SCHWARZ *et al.*, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA-UFRGS), com exceção à etapa de sequenciamento das cepas que foi realizada no laboratório ACTGene Análises Moleculares do Centro de Biotecnologia (Cbiot), também pertencente à UFRGS.

4.1 Cepas de *Pasteurella multocida*

Foram selecionadas 96 cepas de *P. multocida* isoladas de casos clínicos de CA e de suínos no abate (APÊNDICE A). As cepas 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 foram realizados de acordo com Glisson, Sandhu e Hofacre (2008). As cepas foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Broth* - BHI - Oxoid®), meio não seletivo de enriquecimento, 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®). O material foi incubado a 37°C por 24 horas. Após este período, as colônias presentes no ágar sangue foram avaliadas de acordo com a sua morfologia. A coloração de Wright foi utilizada a fim de se observar a característica bipolar da célula bacteriana (OLIVEIRA, 2012). Por último, realizaram-se os testes de catalase e de oxidase, além da utilização do sistema BacTray III (Laborclin®) de testes bioquímicos.

4.2 Caracterização fenotípica

As cepas de *P. multocida* foram caracterizadas fenotipicamente através dos testes bioquímicos selecionados para identificação da subespécie e do biovar a que pertencem, através de testes não sorológicos para identificação do tipo capsular ou sorogrupo e através do comportamento em testes de sensibilidade antimicrobiana.

4.2.1 Identificação da subespécie e do biovar

As cepas estocadas em sangue total ovino a -80°C foram reativadas em BHI (Oxoid[®]) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, as amostras foram semeadas por esgotamento em ágar sangue (Oxoid[®]), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado. Uma colônia de cada amostra foi selecionada para a realização dos testes. Foram realizadas baterias formadas por 10 exemplares em conjunto com cepas de referência (*American Type Culture Collection* - ATCC[®]) selecionadas como controles positivos para cada um dos testes bioquímicos de identificação da subespécie e do biovar (APÊNDICE B).

O caldo descarboxilase de Moeller (Himedia[®]) e o caldo base vermelho de fenol (Merck[®]) foram preparados conforme as instruções dos fabricantes para a realização, respectivamente, dos testes de descarboxilação da ornitina e de fermentação dos carboidratos. A ornitina (Synth[®]) e os carboidratos (Synth[®]) foram adicionados na concentração de 1% aos respectivos meios. Os tubos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 72 horas para os carboidratos ou durante 96 horas para a ornitina e observados a intervalos de 24 horas. Após a incubação, a interpretação dos resultados foi realizada conforme a descrição de MacFaddin (2000).

As 96 cepas de *P. multocida* foram classificadas quanto à subespécie - *multocida*, *septica* e *gallicida* - de acordo com a habilidade das cepas em fermentar os carboidratos sorbitol, dulcitol e trealose (MUTTERS *et al.*, 1985). Cada cepa também foi classificada em um dos 13 biovars de *P. multocida* definidos de acordo com a fermentação dos carboidratos sorbitol, dulcitol, maltose, xilose, trealose, lactose e conforme a presença da enzima ornitina descarboxilase (FEGAN; BLACKALL; PAHOFF, 1995; BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997). As características bioquímicas individuais das subespécies e dos biovars constam no APÊNDICE B.

4.2.2 Testes fenotípicos para identificação do tipo capsular

As cepas foram analisadas para os tipos capsulares ou sorogrupos A e D através do emprego de dois testes fenotípicos não sorológicos. O teste da acriflavina, desenvolvido por Carter e Subronto (1973), foi utilizado para a identificação da cápsula do tipo D. Uma amostra clínica de *P. multocida* toxigênica isolada de suíno, gentilmente cedida pela Dra. Sandra Borowski do Instituto de Pesquisas Veterinárias

Desidério Finamor (IPVDF), foi utilizada como controle positivo do teste. Uma alíquota de 2 mL de cultura bacteriana em BHI *overnight* foi centrifugada a 6000 rpm por 20 minutos. Após o período, 0,5 mL de uma solução de acriflavina a 1:1000 (Sigma Aldrich®) foi adicionada a 0,5 mL do concentrado da cultura. As cepas que apresentaram aglutinação em um intervalo de até 5 minutos foram classificadas no sorogrupo D.

A identificação das cepas do sorogrupo A foi realizada através do teste da hialuronidase, elaborado por Carter e Rundell (1975). As cepas de referência *P. multocida* ATCC 12945 e ATCC 15742 foram selecionadas como controles positivos do teste. As amostras foram semeadas por esgotamento em ágar sangue (Oxoid®), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado, em linhas com intervalos de 5 mm. Após, uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora da enzima hialuronidase foi semeada em ângulo de 90° às linhas anteriores e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Aquelas cepas de *P. multocida* que apresentaram crescimento inibido próximo à semeadura de *S. aureus* foram classificadas no sorogrupo A.

4.2.3 Testes de sensibilidade antimicrobiana

Todas as cepas foram testadas quanto à susceptibilidade a diferentes antimicrobianos através do método de disco difusão em ágar, conforme recomendado pela norma VET 01-A4 do *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), (CLSI, 2013a). Cepas resistentes a no mínimo um antimicrobiano de três ou mais diferentes classes foram consideradas multirresistentes (SCHWARZ *et al.*, 2010).

Inicialmente, as cepas estocadas foram repicadas em 5 mL de BHI e mantidas em incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 16 a 18 horas. Posteriormente, o inóculo foi plaqueado em ágar sangue (Oxoid®), adicionado de 5 % de sangue ovino desfibrinado e as placas mantidas em incubação novamente a 37° C por 16 a 18 horas. Colônias isoladas em ágar sangue foram selecionadas e repassadas para um tubo contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% a fim de se ajustar a concentração da solução à escala padrão 0,5 de Mcfarland. Após 15 minutos do ajuste da concentração, 100 µL da solução foram semeados em placa de petri contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue ovino desfibrinado (MH ágar 5%

sangue - Laborclin[®]). Os discos de antimicrobianos foram adicionados e as placas incubadas a 37° C por 16 a 18 horas.

Cada cepa foi testada frente a nove agentes antimicrobianos (Oxoid[®]): amoxicilina (10 µg), ceftiofur (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), sulfafurazol (300 µg), sulfametoxazol + trimetoprim (1,25-23,75 µg) e tetraciclina (30 µg). O diâmetro dos halos de inibição foi medido e comparado com os padrões internacionais propostos pelo CLSI (CLSI 2010, CLSI, 2013b), e cada cepa classificada como sensível, resistente ou intermediária - parcialmente sensível. As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 foram selecionadas como microrganismos de controle de qualidade do teste de disco difusão em ágar.

As cepas classificadas como intermediárias ou parcialmente sensíveis no primeiro método foram selecionadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do teste de microdiluição em caldo, conforme metodologia e parâmetros descritos na norma VET 01-A4 (CLSI, 2013a). A solução estoque de cada antimicrobiano foi preparada em concentrações de 5120 µg/mL, utilizando-se os solventes e diluentes recomendados na norma M100-S22 (CLSI, 2012). Os antimicrobianos foram diluídos conforme a concentração final necessária para cada princípio ativo.

Colônias de *P. multocida* semeadas em ágar sangue por 16 a 18 horas foram selecionados para suspensão em solução de cloreto de sódio a 0,9%. A solução foi ajustada de acordo com a escala padrão 0,5 de Mcfarland e diluída em 1:10 a fim de se obter uma concentração final do inóculo de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. 100 µL microlitos de cada diluição do antimicrobiano em conjunto com 5 µL de inóculo foram adicionados em uma coluna de uma placa de microdiluição de poliestireno de 96 poços com fundo chato (KASVI[®]). Cada placa apresentou um poço de controle do crescimento do inóculo, um controle negativo não inoculado, além de uma cepa padrão com valor de CIM preconizado para o antimicrobiano em estudo. O caldo Mueller-Hinton com cátion ajustado (Difco[®]) foi utilizado para o preparo das diluições dos antimicrobianos e dos inóculos.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas e, após este período, foi realizada a leitura e determinação dos pontos de corte a partir da visualização da turbidez dos orifícios. As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram selecionadas como microrganismos de controle de

qualidade do teste de microdiluição em caldo. Cada cepa foi classificada como sensível, resistente ou intermediária – parcialmente sensível - de acordo com os padrões internacionais propostos pelo CLSI (CLSI 2010, CLSI, 2013b).

Segundo o CLSI (2013a), a cepa que apresenta sensibilidade a um fármaco classificada como “intermediária” requer doses mais elevadas do antimicrobiano para ser inibida. Uma vez que cepas parcialmente sensíveis não apresentam crescimento inibido *in vitro* na concentração recomendada e que o resultado terapêutico é incerto (RODLOFF *et al.*, 2008), elas foram consideradas resistentes a fim de se classificar as cepas multirresistentes.

4.3 Caracterização genotípica

As cepas utilizadas no estudo foram caracterizadas genotipicamente através da pesquisa de genes associados à virulência pela técnica de multiplex-PCR, através do emprego de dois protocolos de diferenciação molecular por PCR-RFLP e através de sequenciamento.

4.3.1 Extração do DNA

O DNA bacteriano foi extraído utilizando-se o kit comercial de extração *NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel®)*. A extração foi realizada conforme as instruções do fabricante e consiste nas etapas de lise da cepa, de ligação do DNA à membrana de sílica e de sucessivas lavagens, além da eluição final do DNA. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da análise por PCR.

4.3.2 Pesquisa de genes associados à virulência

Inicialmente, todas as cepas foram classificadas no gênero *Pasteurella* e espécie *multocida* através do emprego de um protocolo de PCR estabelecido por Townsend *et al.* (1998), a partir da amplificação de um fragmento de 460 pb do gene *kmt*. 15 genes associados à virulência (*ompH*, *oma87*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *nanB*, *sodA*, *nanH*, *ptfA*, *pfhA*, *toxA*), incluindo-se os genes para tipificação molecular das cápsulas dos tipos A (*hyaD-hyaC*), B (*bcbD*) e D (*dcbF*) foram pesquisados entre todas as cepas de origem aviária e suína, conforme os protocolos de multiplex-PCR estabelecidos por

Furian *et al.* (2011). Outros sete diferentes genes de virulência que codificam fatores de colonização (*hsf-1*, *tadD*), proteínas de membrana externa (*plpB*, *psl*, *ompA*) ou que estão relacionados com aquisição de ferro (*fur*) e com a síntese de hialuronidase (*pmHAS*) pela bactéria também foram pesquisados, conforme os trabalhos de Ewers *et al.* (2006) e de Tang *et al.* (2009), com adaptações (Tabela 1 e 2). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (*Swift MaxPro Thermal Cycler - ESCO Technologies*[®]) e a eletroforese dos produtos amplificados foi desenvolvida em gel de agarose a 1% ou 1,5% corado com brometo de etídeo. Os géis foram fotodocumentados (*AlphaDigDoc Pro - Alpha Innotech*[®]) e posteriormente interpretados.

Tabela 1 - Composição e concentração do mix de reação dos protocolos de PCR para os genes *hsf-1*, *pmHAS*, *fur*, *psl*, *ompA*, *plpB* e *tadD*.

Protocolo	Mix da reação (volume final: 25 µl)
Multiplex-PCR 1 (<i>hsf-1</i> ; <i>pmHAS</i> ; <i>fur</i>)	2,5 µL Tampão 10x, 0,4 µL dNTPs (10 mM - <i>LudwigBiotec</i> [®]), 0,5 µL primers (10 pmol - <i>Invitrogen</i> [®]), 2 U <i>GoTaq</i> [®] <i>Hot Start Polymerase</i> (<i>Promega</i> [®]), 1,25 µL MgCl ₂ (25 mM - <i>Promega</i> [®]), 12,45 µL água ultra pura, 5µL DNA
Multiplex-PCR 2 (<i>psl</i> ; <i>ompA</i>)	2,5 µL Tampão 10x, 0,4 µL dNTPs (10 mM - <i>LudwigBiotec</i> [®]), 0,5 µL primers (10 pmol - <i>Invitrogen</i> [®]), 2 U <i>GoTaq</i> [®] <i>Hot Start Polymerase</i> (<i>Promega</i> [®]), 1,25 µL MgCl ₂ (25 mM - <i>Promega</i> [®]), 13,45 µL água ultra pura, 5 µL DNA
PCR 3 (<i>plpB</i>)	2,5 µL Tampão 10x, 0,4 µL dNTPs (10 mM - <i>LudwigBiotec</i> [®]), 0,5 µL primers (10 pmol - <i>Invitrogen</i> [®]), 2 U <i>GoTaq</i> [®] <i>Hot Start Polymerase</i> (<i>Promega</i> [®]), 1,25 µL MgCl ₂ (25 mM - <i>Promega</i> [®]), 17,45 µL água ultra pura, 2 µL de DNA
PCR 4 (<i>tadD</i>)	2,5 µL Tampão 10x, 0,4 µL dNTPs (10 mM - <i>LudwigBiotec</i> [®]), 0,5 µL de primers (10 pmol - <i>Invitrogen</i> [®]), 2 U <i>GoTaq</i> [®] <i>Hot Start Polymerase</i> (<i>Promega</i> [®]), 1,25 µL MgCl ₂ (25 mM - <i>Promega</i> [®]), 17,45 µL água ultra pura, 2 µL de DNA

Tabela 2 - Condições do termociclador adotadas para os protocolos de PCR para os genes *hsf-1*, *pmHAS*, *fur*, *psl*, *ompA*, *plpB* e *tadD*.

Protocolo	Número de ciclos	Condições do termociclador*		
		Desnaturação	Anelamento	Extensão
Multiplex-PCR 1 (<i>hsf-1</i> ; <i>pmHAS</i> ; <i>fur</i>)	30	94°C – 30s	56°C – 30s	72°C – 60s
Multiplex-PCR 2 (<i>psl</i> ; <i>ompA</i>)	30	94°C – 30s	55°C – 30s	72°C – 60s
PCR 3 (<i>plpB</i>)	30	94°C – 30s	57°C – 30s	72°C – 60s
PCR 4 (<i>tadD</i>)	30	94°C – 30s	57°C – 30s	72°C – 60s

*Desnaturação inicial: 94°C – 3 min.; Extensão final: 72°C – 10 min.

As cepas padrão de *P. multocida* ATCC 15742, ATCC 12945 e ATCC 12946, respectivamente isoladas de peru, galinha e búfalo, além de uma amostra clínica de *P. multocida* toxigênica isolada de suíno, foram utilizadas como controles positivos dos testes. Os controles negativos foram selecionados entre diferentes membros da família *Pasteurellacea*. São microrganismos que possuem homologia com *P. multocida*, mas que não podem hibridizar com as sequências alvo dos genes selecionados. Os controles negativos utilizados foram: *Riemerella anatipestifer* ATCC 11845, *Mannheimia haemolytica* ATCC 29694 e *Avibacterium gallinarum* ATCC 13360. Todos os protocolos foram repetidos três vezes. No APÊNDICE C consta a relação dos 22 genes de virulência selecionados, seus processos ou funções enzimáticas relacionadas, as sequências dos primers e o tamanho aguardado dos amplicons.

4.3.3 PCR-RFLP

Dois diferentes protocolos de PCR-RFLP foram avaliados quanto à capacidade de tipificação molecular dos isolados de *P. multocida* de origem aviária a partir da amplificação de regiões dos genes *ompH* e *oma87*. O protocolo descrito por Furian (2011) foi utilizado para amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb do gene *oma87*.

O mix da reação de PCR para amplificação de um fragmento de 1000 pb do gene *ompH* foi baseado no trabalho de Sellyei, Ivanics e Magyar (2013) com adaptações. O mix - volume final de 25 µL - foi constituído por 2,5 µL de Tampão 10x, 2 µL de dNTPs (2,5 mM - *LudwigBiotec*®), 2 µL de cada primer (10 pmol - *Invitrogen*®), 1,5 U da enzima *GoTaq*® *Hot Start Polymerase* (*Promega*®), 0,75 µL de MgCl₂ (25 mM - *Promega*®), 13,45 µL de água ultra pura e 2 µL de DNA. A sequência dos oligonucleotídeos utilizados e as condições do termociclador adotadas para ambos os protocolos são descritas nas Tabelas 3 e 4.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (*Swift MaxPro Thermal Cycler - ESCO Technologies*®) e a eletroforese dos produtos amplificados foi desenvolvida em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. As enzimas de restrição foram selecionadas a partir da elaboração de um mapa de restrição virtual utilizando o programa *Restriction Mapper*, versão 3.0.

Tabela 3 - Genes selecionados para o PCR-RFLP, processo ou função enzimática relacionada, sequência e referência dos primers, tamanho dos amplicons.

Gene	Processo ou enzima	Sequência dos primers (5' - 3')	Referência dos primers	Amplicon (pb)
<i>ompH</i>	proteína de membrana externa	GCGTTTCATTCAAAGCATCTC ATGACCGCGTAACGACTTTC	Antony <i>et al.</i> (2007)	1000
<i>oma87</i>	proteína de membrana externa	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	Ewers <i>et al.</i> (2006)	948

Tabela 4 - Condições do termociclador adotadas para os protocolos de PCR dos genes *ompH* e *oma87* que foram selecionados para posterior digestão enzimática.

Multiplex	Número de ciclos	Condições do termociclador*		
		Desnaturação	Anelamento	Extensão
PCR 1 (<i>ompH</i>)	35	94°C – 15s	56°C – 60s	72°C – 60s
PCR 2 (<i>oma87</i>)	25	94°C – 30s	55°C – 30s	72°C – 60s

*Desnaturação inicial: 94°C – 5 min.; Extensão final: 72°C – 10 min.

Os amplicons dos genes *ompH* e *oma87* foram digeridos com 10 U das enzimas de restrição *DraI* ou *HindIII* (*Invitrogen*®), conforme o protocolo recomendado pela fabricante. Após o desenvolvimento de eletroforese em gel de agarose a 2%, as bandas geradas foram analisadas em transluminador de luz UV (*Pharmacia LKB MacroVue*®) e o comprimento dos fragmentos comparados com um marcador de peso molecular de 100 pb (*KASVI*®). As cepas de *P. multocida* foram agrupadas em perfis, de acordo com o padrão de clivagem observado para os dois protocolos de PCR-RFLP. Os resultados dos protocolos foram fotodocumentados (*Alpha Innotech*®) e comparados quanto à tipabilidade (T) e ao índice de diversidade de Simpson ou poder discriminatório (D) das técnicas, conforme fórmulas descritas abaixo por Hunter e Gaston (1998):

* Tipabilidade (T):

$$T = \frac{TP}{N}$$

Legenda:

T: tipabilidade

TP: amostras tipificadas

N: número total de amostras dentro da população

* Índice de diversidade de Simpson ou poder discriminatório (D):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j (n_j - 1)$$

Legenda:

D: poder discriminatório

N: número total de amostras dentro da população

s: número de grupos ou tipos existentes

n_j: número de amostras presentes em cada grupo ou tipo

4.3.4 Sequenciamento

Um grupo de cepas representativas de cada perfil observado no protocolo de PCR-RFLP com o maior poder discriminatório (D) foi sequenciado para a determinação exata dos sítios de restrição. Cada cepa foi sequenciada em triplicata. Inicialmente, os amplicons foram purificados utilizando-se o kit comercial de purificação em coluna *QUIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®)*. Após, o DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, tendo como parâmetro o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®)*, e através do emprego do kit comercial *Quant- iT dsDNA HS Assay (Invitrogen®)* com leitura no fluorímetro QUBIT® fluorometer (*Invitrogen®*).

Posteriormente, 50 ng de DNA molde foram pipetados em um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, adicionado de 4,5 pmol do oligonucleotídeo específico e de água ultrapura, atingindo-se um volume final de 6 µL. O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando-se o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems®)* armado com capilares de 50 cm e com o polímero *POP6 (Applied Biosystems®)*. Os DNA-moldes (50 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do primer *forward* ou 2,5 pmol do primer *reverse* e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems®)* em um volume final de 10 µL.

As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®)* com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com

isopropanol a 75% e pela lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (*Applied Biosystems*®), desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v. 1.0.1* (*Applied Biosystems*®) com os parâmetros *Dye Set “Z”*; *Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”*; *BioLIMS Project “3100_Project1”*; *Run Module 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”*; e *Analysis Module 1 “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”*.

As sequências oriundas dos primers *forward* e *reverse* foram analisadas quanto a sua qualidade através dos eletroferogramas gerados e *contigs* construídos através do programa *Seqman Pro* do pacote *DNASTar Lasergene*®. Após a obtenção de sequências de consenso, foi realizado o alinhamento múltiplo dos dados pelo método *Clustal W* juntamente de sequências de diferentes sorotipos de *P. multocida* disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), sob os seguintes números de acesso: U52200.1, U52201.1, U52202.1, U52203.1, U52204.1, U52205.1, U52206.1, U52207.1, U52208.1, U52209.1, U52210.1, U52211.1, U52212.1, U52213.1, AJ459785, AY603962.1 e AY864815. A inferência filogenética foi realizada através do algoritmo *Neighbor-Joining*, utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*® (*MEGA*), v. 6.06. Adicionalmente, um limite de similaridade através da diferença entre todos os possíveis pares de sequências mais próximas (*pairwise distance*) foi estabelecido através deste mesmo programa.

4.4 Identificação de genes marcadores de patogenicidade

O objetivo desta etapa foi identificar entre os 22 genes de virulência pesquisados aqueles associados aos níveis de patogenicidade em cada um dos hospedeiros. Os índices de patogenicidade calculados em uma escala de 0 a 10 a partir da inoculação experimental de pintos no estudo desenvolvido por Pilatti (2014) e descritos no APÊNDICE D foram utilizados para a análise.

Neste estudo prévio, as 96 cepas de *P. multocida* 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, 2014). Um método de inferência condicional através do emprego de árvores de classificação para cada um dos 22 genes associados à virulência utilizando-se o

programa computacional R (*The R Project for Statistical Computing*[®]) a partir da função *ctree* do pacote *party*.

4.5 Análises estatísticas

- A análise de estatística descritiva foi empregada nos estudos fenotípicos para a determinação da frequência de resistência antimicrobiana individual, assim como para a determinação da frequência das subespécies e dos biovars de *P. multocida*. Os mesmos cálculos também foram empregados para o cálculo da frequência absoluta e relativa dos genes de virulência e dos sorogrupos, dos grupos moleculares do PCR-RFLP, assim como no agrupamento das cepas em perfis genéticos nos testes genotípicos.
- Os testes não paramétricos do Qui-quadrado (χ^2) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para análise da distribuição das subespécies e dos sorogrupos de *P. multocida*, para determinar se existe associação da presença dos genes de virulência conforme o hospedeiro de isolamento e conforme o sorogrupo das cepas, para análise da associação dos genes de virulência aos pares e para comparar a capacidade de tipificação capsular dos testes fenotípicos e moleculares.
- O agrupamento das amostras pelo método UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*) e definição de grupos foi realizado utilizando-se o programa computacional R (função *hclust* do pacote *agnes*).
- O teste não paramétrico de McNemar foi utilizado para comparar as frequências dos genes de virulência dentro dos grupos de igual função.
- A determinação do coeficiente kappa (k) foi empregada para avaliar a concordância dos resultados dos testes de tipificação capsular.
- O índice de diversidade de Simpson ou poder discriminatório (D) e a tipabilidade (T) dos protocolos de PCR-RFLP foram calculados conforme a fórmula descrita por Hunter e Gaston (1998).
- O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação das médias dos índices de patogenicidade das cepas de origem aviária conforme o grupo ou tipo molecular do PCR-RFLP.
- Um método de inferência de árvores de decisão através do programa computacional R (função *ctree* do pacote *party*) foi utilizado para determinar possíveis genes marcadores patogênicos.

- Os programas *Statistical Package for Social Sciences*[®] (SPSS), programa computacional R (*The R Project for Statistical Computing*[®]) e *Microsoft Excel*[®] foram utilizados para as análises estatísticas, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fenotípica

5.1.1 Identificação da subespécie e do biovar

Dentre os 56 isolados de origem aviária, 87,5% (49/56) foram classificados na subespécie *multocida*, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à frequência das subespécies *septica* e *gallicida*. Da mesma forma, 87,5% (35/40) dos isolados de origem suína foram classificados na mesma subespécie, a qual foi majoritária em relação às demais ($p < 0,05$). Os resultados obtidos através do emprego de testes bioquímicos para a identificação da subespécie de *P. multocida* estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequências absoluta e relativa (%) das subespécies de *Pasteurella multocida* identificadas através de testes bioquímicos conforme a origem das cepas analisadas.

Subespécie	Origem		Total (n=96)
	Aves (n=56)	Suínos (n=40)	
<i>P. multocida</i> ssp. <i>multocida</i>	49 (87,5) ^a	35 (87,5) ^a	84 (100)
<i>P. multocida</i> ssp. <i>septica</i>	6 (10,7) ^b	0 (0,0) [*]	6 (100)
<i>P. multocida</i> ssp. <i>gallicida</i>	1 (1,8) ^b	5 (12,5) ^b	6 (100)

*variável constante.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os testes de fermentação de carboidratos para a classificação das subespécies de *P. multocida* apresentam a simplicidade de execução como principal vantagem (BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997). Os resultados obtidos estão de acordo com o observado em outros estudos em diferentes regiões do mundo (MUHAIRWA *et al.*, 2001; PEDERSEN *et al.*, 2003; EIGAARD *et al.*, 2006; LEOTA *et al.*, 2006; VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007; GARCIA *et al.*, 2011; STĘPNIEWSKA; MARKOWSKA-DANIEL, 2013; CASTILLO *et al.* 2014).

Geralmente, as subespécies *gallicida* e *septica* - identificadas em 12 cepas deste estudo - são isoladas, respectivamente, de aves aquáticas e de lesões em seres humanos causadas por cães e gatos (HIRSH *et al.*, 1990; MUHAIRWA *et al.*, 2001; VARGA;

SELLYEI; MAGYAR, 2007). A menor ocorrência destes exemplares em galinhas e em perus também foi constatada no trabalho de Fegan, Blackall e Pahoff (1995) que identificou somente um isolado pertencente à subespécie *septica* e cinco à subespécie *gallicida* entre as 110 cepas analisadas na Austrália. O mesmo grupo também observou a ocorrência inferior a 10% da subespécie *gallicida* entre os isolados de suínos (BLACKALL; PAHOFF; BOWLES 1997). Da mesma forma, a dominância da subespécie *multocida* é constatada em trabalhos semelhantes e mais recentes realizados na Tanzânia, na Dinamarca e na Argentina, tanto em galinhas quanto em suínos (PEDERSEN *et al.*, 2003; LEOTA *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2011; STĘPNIEWSKA; MARKOWSKA-DANIEL, 2013).

Além da relação com um determinado hospedeiro, alguns trabalhos mais antigos sugerem variações no potencial patogênico das cepas conforme a subespécie envolvida no caso clínico (BIBERSTEIN *et al.*, 1991; HOLST *et al.*, 1992). Assim, as subespécies *multocida* e *septica* seriam mais frequentemente isoladas de casos graves de infecção com intensa bacteremia. Portanto, a classificação das subespécies poderia ter tanto uma importância clínica, quanto epidemiológica (HUNT; ADLERA; TOWNSEND, 2000). Contudo, não foi observada nenhuma associação entre os índices de patogenicidade obtidos *in vivo* (PILATTI, 2014) e as subespécies de *P. multocida* identificadas nas cepas analisadas no atual estudo ($p > 0,05$), independentemente da origem do hospedeiro.

As subespécies também podem ser associadas a um determinado nicho ou tecido do organismo. A subespécie *multocida*, assim como ocorre em aves e em suínos, é a mais comumente observada no trato respiratório dos seres humanos nos poucos trabalhos que realizaram a classificação das cepas isoladas neste hospedeiro (CHEN; HULTEN; CLARRIDGE, 2002; DONNIO; LERESTIF-GAUTIER; AVRIL, 2004). Esta mesma subespécie também pode ser isolada das injúrias na pele provocadas por cães e gatos. Entretanto, a subespécie *septica* é a mais frequentemente associada aos casos em que existe o contato humano com felinos e geralmente as cepas apresentam uma maior afinidade pelo sistema nervoso central (BIBERSTEIN *et al.*, 1991; CHEN; HULTEN; CLARRIDGE, 2002). Apesar da associação da subespécie *multocida*, majoritária neste estudo, com os casos de CA e com o trato respiratório das aves (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012), esta subespécie também já foi isolada de aves com salpingite (BISGAARD, 1995).

Contudo, os isolados de *P. multocida* podem apresentar uma atividade bioquímica heterogênea, assim ocorrendo uma classificação contraditória da espécie e

da subespécie do organismo através dos testes bioquímicos (CHRISTENSEN *et al.*, 2005). No estudo, 8,3% (7/84) das cepas da subespécie *multocida* e 50% (3/6) da subespécie *gallicida* fermentaram lactose. Apesar de *P. multocida* não se caracterizar por produzir ácido a partir deste açúcar, em algumas ocasiões podem ser encontradas cepas lactose positiva (LEOTA *et al.*, 2006a).

Da mesma forma, a fermentação da maltose não é uma característica fundamental para a identificação da bactéria em certos casos, pois cepas maltose positiva e negativa das subespécies *septica* e *multocida* já foram reportadas (PETERSEN; CHRISTENSEN; BISGAARD, 1998). No atual trabalho, 50% (3/6) dos isolados da subespécie *septica* e 9,5% (8/84) da subespécie *multocida* fermentaram este açúcar. As variações em relação à atividade da enzima ornitina descarboxilase conforme a subespécie envolvida também foram observadas no estudo, assim como relatado por Fegan, Blackall e Pahoff (1995).

Além das variações anteriores, a discriminação em subespécies através da fermentação do sorbitol, do dulcitol e da trealose também pode apresentar resultados ambíguos (GERARDO *et al.*, 2001; CHRISTENSEN *et al.*, 2005; CHRISTENSEN *et al.*, 2007, STAHEL *et al.*, 2009; VARGA *et al.*, 2013). Como exemplo, há cepas que não fermentam o sorbitol, mas que apresentam características bioquímicas relacionadas à subespécie *multocida* (VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007).

A diferenciação pode ser especialmente prejudicada pela fermentação da trealose, carboidrato utilizado por *multocida* e *septica*, conforme as características bioquímicas apresentadas por cepas de referência (FEGAN; BLACKALL; PAHOFF, 1995). Contudo, no estudo aproximadamente 71% (64/90) dos isolados classificados em ambas as subespécies não fermentaram a trealose. Da mesma forma, Varga, Sellyei e Magyar (2007) também constataram que 81,1% (103/127) dos isolados classificados na subespécie *multocida* foram negativos para a fermentação do mesmo açúcar. Além disto, 66,7% (10/15) das cepas da subespécie *septica* também não fermentaram a trealose no mesmo trabalho.

Logo, a utilização de técnicas moleculares é importante para a confirmação da espécie envolvida (DZIVA *et al.*, 2008). Independentemente dos biovares identificados no atual estudo, além dos isolados não tipificados através do sistema de Fegan, Blackall e Pahoff (1995) e Blackall, Pahoff e Bowles (1997), todas as cepas no trabalho foram confirmadas através de PCR na espécie *multocida*.

Assim como sugerido para o diagnóstico da espécie, o uso da análise molecular através da leitura da sequência comparativa do RNA ribossomal 16S (rRNA) ou da sequência multilocus de genes *housekeeping* têm apresentado sucesso para a identificação e para o esclarecimento da relação filogenética das subespécies (KUHNERT; KORCZAK, 2006; STAHEL *et al.*, 2009; WILSON; HO, 2013). A classificação fenotípica geralmente diverge do reconhecimento molecular. Especialmente a fermentação do sorbitol é considerada imprecisa na diferenciação das subespécies que são dulcitol negativo (STAHEL *et al.*, 2009; SELLYEI *et al.*, 2012). Apesar do sequenciamento que foi realizado no atual trabalho de cepas de cada perfil gerado através da técnica de PCR-RFLP, sugere-se futuramente o emprego de uma das técnicas citadas com o intuito da investigação epidemiológica e da avaliação da concordância dos resultados da classificação das subespécies através dos testes bioquímicos e moleculares.

Em relação aos biovares, o perfil 3, seguido dos biovares 13 e 9, foram os mais comuns entre as cepas de origem aviária, sendo identificados em 35,7% (20/56), 23,2% (13/56) e em 12,5% (7/56) dos casos, respectivamente. Estes biovares também foram predominantes entre os isolados de origem suína. Contudo, a ocorrência de cepas dos perfis bioquímicos 3 e 9 foi igual, ao contrário do observado nas cepas de aves (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência relativa (%) dos biovares de *Pasteurella multocida* identificados conforme a origem das cepas analisadas.

Origem	1	2	3	5	7	8	9	10	13	NT*
Aves (n=56)	8,9	7,1	35,7	3,6	1,8	1,8	12,5	3,6	23,2	1,8
Suínos (n=40)	0	10	25	0	0	10	25	0	20	10

*NT: não tipificável.

Observação: nenhuma cepa de ambas as origens foi classificada nos biovares 4, 6, 12 e 14.

As cepas foram classificadas em 9 dos 13 biovares descritos por Fegan, Blackall e Pahoff (1995) e por Blackall, Pahoff e Bowles (1997). O biovar 3 foi o tipo bioquímico mais identificado, assim como observado em outros trabalhos, apesar da menor ocorrência relatada no atual estudo em relação a estas pesquisas (JAMALUDIN *et al.*, 2005; LEOTTA *et al.*, 2006a; VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007; GARCIA *et al.*, 2011; STEPNIIEWSKA *et al.*, 2013; VARGA *et al.*, 2013).

Contudo, o alto percentual do biovar 9 entre as cepas suínas e do biovar 13, independentemente da origem, não são citados na literatura. A descrição inicial do biovar 13 presente de forma esporádica em suínos ocorreu na Austrália em 1997 (BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997) e recentemente foi identificado em um isolado proveniente de um surto de pasteurelose septicêmica em suínos (TOSET *et al.*, 2013). Os biovars 13 e 9 não apresentam atividade da enzima ornitina descarboxilase e são, respectivamente, considerados variantes dos biovars 3 e 2, também comuns à subespécie *multocida* que foi predominante no estudo (BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997; VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007).

Um pequeno número de cepas não foi classificado em nenhum dos biovars e estas também foram consideradas variantes dos perfis comuns a cada subespécie de *P. multocida*. A frequência relativa (%) dos biovars identificados conforme a subespécie dos isolados é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Frequência relativa (%) dos biovars de *Pasteurella multocida* identificados nas cepas analisadas e distribuídos conforme a subespécie.

Subespécie	1	2	3	5	7	8	9	10	13	NT*
<i>P. multocida</i> spp. <i>multocida</i> (n=84)	5,2	8,3	31,3				17,7		21,9	3,1**
<i>P. multocida</i> spp. <i>septica</i> (n=06)				2,1	1,0			2,1		1,0***
<i>P. multocida</i> spp. <i>gallicida</i> (n=06)						5,2				1,0****

*NT: não tipificável (** variante lactose negativa, maltose positiva, trealose positiva; *** variante xilose negativa; **** variante ornitina descarboxilase negativa).

Observação: nenhuma cepa foi classificada nos biovars 4, 6, 12 e 14.

Nenhum dos 22 genes de virulência apresentou uma diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nas suas distribuições conforme o biovar observado no atual trabalho. A associação dos biovars com a ocorrência dos genes de virulência detectados em *P. multocida* somente é descrita na literatura em um trabalho que foi desenvolvido na Espanha. GARCIA *et al.* (2011) observaram diferença na frequência dos genes *pfhA* e *hgbB* entre os biovars 2 e 3, além destes terem sido agrupados em dois *clusters* distintos através da técnica de PFGE.

O fator limitante na utilização dos esquemas de tipos bioquímicos consiste no grande número de isolados não classificados em nenhum dos biovars descritos (DZIVA *et al.*, 2008) e na pequena capacidade de diferenciação entre as cepas (VARGA; SELLYEI; MAGYAR, 2007). Neste trabalho, 1,8% das cepas aviárias (1/56) e 10% das cepas de suínos (4/40) não foram identificadas em nenhum dos biovars descritos.

Além disto, as condições da cultura bacteriana podem influenciar a expressão fenotípica, assim diminuindo a segurança e a reprodutibilidade dos testes (MATSUMOTO; STRAIN, 1993). Devido ao pequeno poder discriminatório ou à existência de muitos isolados que não podem ser classificados, as técnicas fenotípicas não provêm uma adequada caracterização dos isolados para estudos epidemiológicos (GARCIA *et al.*, 2011). Assim, a correta identificação do microrganismo depende de métodos fenotípicos e genotípicos (CHRISTENSEN *et al.*, 2005), apesar dos testes bioquímicos serem uma alternativa para testes iniciais em laboratórios de menor porte.

5.1.2 Testes fenotípicos para identificação do tipo capsular

A maioria dos isolados de *P. multocida*, independentemente da origem, foi classificada no tipo capsular ou sorogrupo A. Não foi possível tipificar através do emprego dos testes fenotípicos não sorológicos 20,4% (11/54) dos isolados de CA e 10% (4/10) das cepas de suínos. As frequências absolutas e relativas observadas para a classificação dos tipos capsulares A e D dos isolados de origem aviária e suína são apresentadas na Tabela 8. A comparação da capacidade de tipificação das cápsulas dos sorogrupos A e D através dos testes fenotípicos não sorológicos selecionados e do multiplex-PCR é descrita no item 5.2.4. As cepas padrão de *P. multocida* ATCC 12945 e 15742 foram selecionadas como controles positivos e não foram consideradas nos resultados deste teste.

Tabela 8 - Frequências absoluta e relativa (%) dos sorogrupos de *Pasteurella multocida* identificados através dos testes fenotípicos não sorológicos conforme a origem das cepas analisadas.

Origem	Sorogrupo		
	A	D	NT**
Aves (n=54)*	41 (75,9) ^a	2 (3,7) ^a	11 (20,4) ^a
Suíños (n=40)	29 (72,5) ^a	7 (17,5) ^a	4 (10) ^a

*Total de amostras excluindo-se as cepas utilizadas como controles positivos.

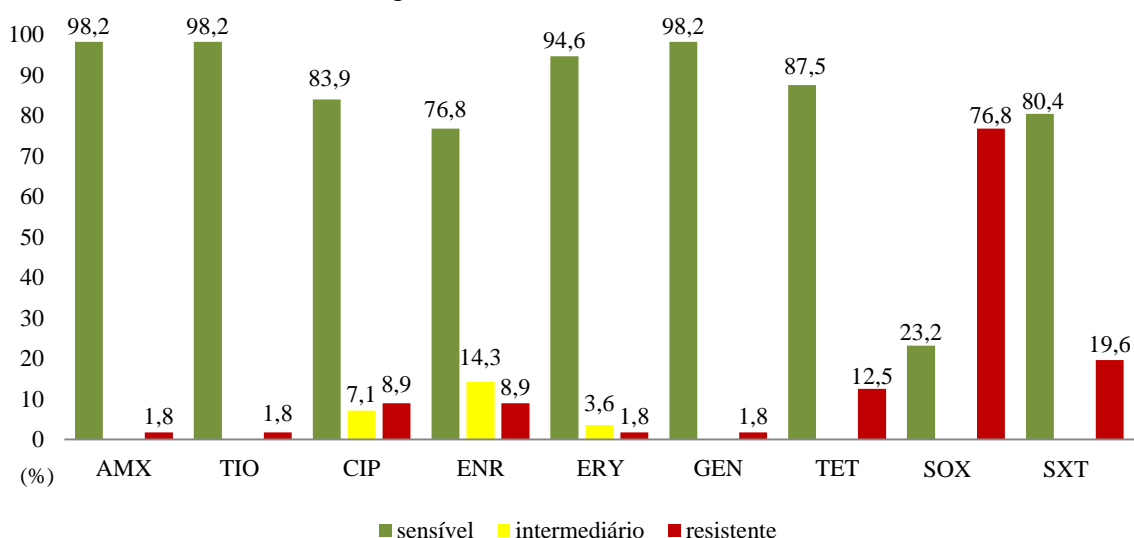
**NT: não tipificável.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.1.3 Testes de sensibilidade antimicrobiana

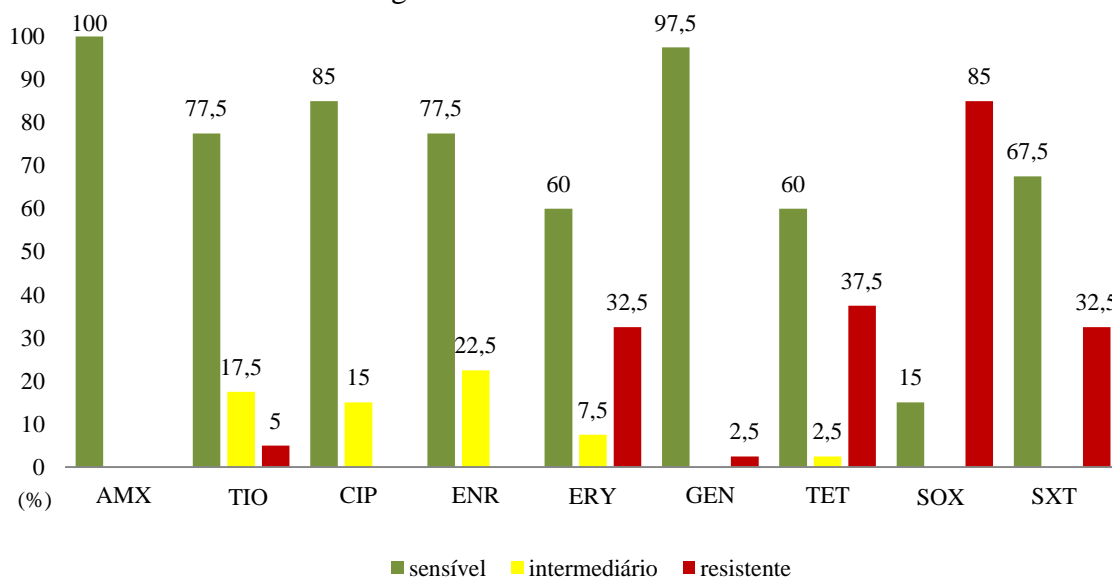
Os resultados de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *P. multocida* obtidos através da técnica de disco difusão em ágar estão descritos nos Gráficos 1 e 2. Nenhuma droga foi efetiva em inibir o crescimento de 100% dos isolados de aves, mas as taxas de susceptibilidade das cepas foram superiores a 80% para os antimicrobianos testados, com exceção à enrofloxacina e ao sulfafurazol. Por outro lado, somente amoxicilina, ciprofloxacina e gentamicina inibiram o crescimento de mais de 80% das cepas de origem suína.

Gráfico 1 - Susceptibilidade antimicrobiana das 56 cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária frente aos nove antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar.



Legenda: AMX= amoxicilina, TIO= ceftiofur, CIP= ciprofloxacina, ENR= enrofloxacina, ERY= eritromicina, GEN= gentamicina, SOX= sulfafurazol, SXT= sulfametoxazol + trimetoprim, TET= tetraciclina.

Gráfico 2 - Susceptibilidade antimicrobiana das 40 cepas de *Pasteurella multocida* de origem suína frente aos nove antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar.



Legenda: AMX= amoxicilina, TIO= ceftiofur, CIP= ciprofloxacina, ENR= enrofloxacina, ERY= eritromicina, GEN= gentamicina, SOX= sulfafurazol, SXT= sulfametoxazol + trimetoprim, TET= tetraciclina.

A antimicrobianoterapia consiste em uma ferramenta efetiva no tratamento das infecções causadas por *P. multocida*. Todas as cepas foram sensíveis para, no mínimo, dois dos antimicrobianos testados no estudo. A alta sensibilidade dos isolados de ambas as origens à amoxicilina, à gentamicina e ao ceftiofur, o último especialmente entre as cepas aviárias, também foi observada em outras pesquisas em diferentes países (YOSHIMURA *et al.*, 2001; HUANG; LIN; WU, 2009; TANG *et al.*, 2009; HABRUN *et al.*, 2010), assim como no Brasil (BOROWSKI *et al.*, 2002a; SOARES *et al.*, 2009). Ao contrário de alguns trabalhos que reportam a baixa atividade de aminoglicosídeos em infecções causadas por *P. multocida* (YOSHIMURA *et al.*, 2001; SELLYEI; WEHMANN; MAGYAR, 2009), a gentamicina foi efetiva no estudo. Da mesma forma, a resistência geralmente observada à eritromicina (SHIVACHANDRA *et al.* 2004; SELLYEI; WEHMANN; MAGYAR, 2009) não foi constatada entre os isolados de aves.

Por outro lado, observou-se uma alta resistência ao mesmo fármaco restrita às cepas isoladas de suínos. Os macrolídeos e as lincosamidas são importantes fármacos para o tratamento de infecções bacterianas em suínos, incluindo-se as de origem respiratória, e a resistência de outros microrganismos a tais classes de antimicrobianos é

considerada frequente (PYORALA *et al.*, 2014). Contudo a resistência das cepas de *P. multocida* isoladas de suínos aos macrolídeos é raramente observada, especialmente na Europa (KASPAR; SCHRÖER; WALLMANN, 2007).

Também se observou que 37,5% (15/40) das cepas suínas foram multirresistentes, enquanto que entre aquelas de origem aviária, 8,9% (5/56) foram resistentes a três ou mais antimicrobianos. As cepas multirresistentes e os índices de patogenicidade calculados por Pilatti (2014) não apresentaram associação significativa ($p>0,05$).

Os maiores percentuais de resistência observados, independentemente do hospedeiro, foram relacionados à sulfonamida, associada ou não com trimetoprim, e também à tetracilina. Entre os fármacos comumente utilizados em medicina veterinária, as tetraciclinas são amplamente empregadas (KEHRENBERG *et al.*, 2001; CHOPTA *et al.*, 2001 *apud* HUANG; LIN; WU, 2009), o que justifica o alto percentual de resistência no estudo e na literatura (BABETSA *et al.*, 2012; MOHAMED *et al.*, 2012; DAYAO *et al.*, 2014). A baixa efetividade das sulfonamidas, que são indicadas para o tratamento de CA e de doenças respiratórias em suínos (MOHAMED *et al.*, 2012; DAYAO *et al.*, 2014), também foi constatada em outros trabalhos (SHIVACHANDRA *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2009). O perfil de resistência antimicrobiana e a classificação de multirresistência individual das cepas estão descritos no APÊNDICE E.

O aumento da multirresistência antimicrobiana nos últimos anos em cepas isoladas dos animais é justificado, em parte, pelo extenso emprego terapêutico (TANG *et al.*, 2009). Da mesma forma, a transferência horizontal de genes através de elementos genéticos móveis entre espécies e gêneros bacterianos distintos favorece o desenvolvimento da multirresistência (WALSH; FANNING, 2008). A presença da bactéria em um ambiente geralmente com diferentes microrganismos possibilita às cepas de *P. multocida* adquirirem genes de resistência a partir da pressão seletiva em outras bactérias (WASSENAAR; SILLEY, 2008). Além disto, a multirresistência não é hospedeiro-específica e pode ser transferida entre diferentes espécies de animais de produção. Grande parte dos genes de resistência descritos em *Pasteurella* spp. - *tet(B)*, *catAI*, *catAIII*, *sulIII* ou *strA* - são possivelmente originários de enterobactérias ou são resultado da recombinação interplasmidial de diferentes espécies (KEHRENBERG *et al.*, 2001; KEHRENBERG; SCHWARZ, 2005).

Os benefícios e os riscos do uso de antimicrobianos em animais de produção são diversos (HAO *et al.*, 2014). Apesar do emprego de antimicrobianos como promotores

de crescimento apresentar resultados controversos quanto ao potencial de transmissão de resistência para os seres humanos (KELLY *et al.*, 2004; MATHEW; CISELL; LIAMTHONG, 2007), a pressão de seleção aumentou a vantagem dos organismos-alvo em transferir genes entre as populações bacterianas com o uso de antimicrobianos comuns em animais e na medicina humana (MATHEW; CISELL; LIAMTHONG, 2007, HAO *et al.*, 2014, MICHAEL *et al.*, 2015). Contudo, isolados de *P. multocida* originários de aves e de suínos não apresentam potencial zoonótico relatado (WILSON; HO, 2013). Além disto, cepas isoladas de gatos e associadas aos casos de infecção dos seres humanos ainda apresentam altos percentuais de susceptibilidade aos antimicrobianos de amplo espectro, especialmente a penicilinas e seus derivados (FRESHWATER, 2008; OEHLER *et al.* 2009).

As cepas foram classificadas como intermediárias ou parcialmente sensíveis pelo teste de disco difusão em ágar em 38 casos frente a cinco antimicrobianos - ceftiofur, ciprofloxacina, enrofloxacin, eritromicina, tetraciclina - e foram selecionadas para a determinação da CIM através do teste de microdiluição em caldo. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9. Um destaque é o alto percentual observado de cepas intermediária às quinolonas, como a enrofloxacin, proibida nos Estados Unidos desde 2005 em aves (CLSI, 2013b).

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos avaliados para as cepas de *Pasteurella multocida* independentemente da origem que apresentaram resultado intermediário através do teste de disco-difusão em ágar.

Antimicrobiano	Número de isolados com CIM de ($\mu\text{g/mL}$):															Total de cepas	Ponto de corte* CIM ($\mu\text{g/mL}$)	% sensibilidade	% resistência	
	$\leq 0,03$	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512					≥ 1024
Ceftiofur	2				2											2	6	8	66,7	33,3
Ciprofloxacina	2				1	4	3										10	4	100	0,0
Enrofloxacina	4		2			6	5										17	2	70,6	29,4
Eritromicina								3	1								4	8	75	25
Tetraciclina									1								1	2	0,0	100

* Os valores são baseados nos padrões descritos pelo CLSI (CLSI 2010, CLSI, 2013b).

Escala em cinza representa as concentrações antimicrobianas consideradas para a classificação das cepas sensíveis ao respectivo fármaco.

A partir do valor da CIM observado e dos pontos de corte preconizados para cada fármaco, 100% das cepas anteriormente classificadas como intermediárias contra a ciprofloxacina (10/10) foram consideradas sensíveis através do teste de microdiluição. Por outro lado, 75% (3/4) das cepas foram sensíveis frente à eritromicina, 70,6% (12/17) à enrofloxacinina e 66,7% (4/6) ao ceftiofur. A única cepa testada frente à tetraciclina foi resistente (1/1) através deste método.

A infecção causada por uma cepa intermediária pode ser adequadamente tratada em locais do corpo em que as drogas são fisiologicamente concentradas ou com o emprego de uma dose elevada do medicamento. Contudo, cepas intermediárias também indicam uma zona tampão que deve impedir que pequenos fatores técnicos e fora de controle causem grandes discrepâncias na interpretação dos testes (CLSI, 2013a). A determinação da CIM possibilitou gerar um resultado quantitativo para as cepas do estudo, as quais em diagnóstico terapêutico também devem ser reportadas aos veterinários clínicos (JORGENSEN; FERRARO, 2009; CLSI, 2013a; RUBIN, 2013).

O desenvolvimento e o uso de novos antimicrobianos são geralmente acompanhados, em um período de tempo variável, pela detecção de cepas que exibem resistência a estes mesmos agentes. Além disto, é impossível prevenir a disseminação de elementos genéticos móveis dentro da população bacteriana (MICHAEL *et al.*, 2015). Logo, os profissionais envolvidos no setor devem preservar a eficácia dos antimicrobianos disponíveis pelo maior tempo possível através de um uso criterioso baseados em resultados de susceptibilidade *in vitro* e associado com medidas de biossegurança nas granjas (LANDONI; ARBARELLOS, 2014).

5.2 Caracterização genotípica

5.2.1 Distribuição dos genes associados à virulência

A patogenicidade das cepas de *P. multocida* ainda está pouco elucidada, apesar de a CA representar uma das patologias aviárias mais antigas e ser uma doença base para o diagnóstico diferencial de enfermidades com notificação obrigatória que cursam com morte súbita, como a influenza aviária (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006; DZIVA *et al.*, 2008). Uma provável razão para a falta de um maior conhecimento consiste no menor uso de ferramentas de manipulação e de análise genética, quando comparado a outras espécies bacterianas nos últimos 25 anos (HARPER; BOYCE;

ADLER, 2012). A primeira cepa 100% sequenciada de *P. multocida* ocorreu somente em 2001 (MAY *et al.*, 2001), e por um período de uma década nenhum novo genoma foi determinado (BOYCE *et al.*, 2012).

Entretanto, as pesquisas recentes de análise genética de *P. multocida* devem auxiliar na elucidação dos mecanismos patogênicos e da associação da bactéria com diferentes hospedeiros (BOYCE *et al.*, 2012). Exemplos são os trabalhos que realizaram a análise da transcrição conjunta de até 2000 genes simultaneamente ou de estudos de análise proteômica que têm auxiliado a esclarecer qual a resposta do crescimento bacteriano na presença de antibióticos ou de baixas concentrações de ferro (PAUSTIAN *et al.* 2002; BOYCE *et al.*, 2006; MELNIKOW *et al.*, 2008).

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 (EWERS *et al.*, 2006; ATASHPAZ; SHAYEGH; HEJAZI, 2009; BETHE *et al.*, 2009; SHAYEGH *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009, RAJKHOWA, 2015), pois a análise de genótipos de virulência baseada na detecção de diferentes perfis consiste em uma ferramenta importante para a caracterização molecular de patógenos bacterianos (BLUME *et al.*, 2009, RAJKHOWA, 2015).

As frequências absolutas e relativas dos 22 genes de virulência pesquisados estão descritas na Tabela 10. A maioria dos genes apresentou uma alta frequência e uma distribuição regular, independentemente da origem das cepas. A alta frequência dos genes analisados no atual estudo também foi observada em outros trabalhos com cepas provenientes de ambos hospedeiros (EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009).

Tabela 10 - Distribuição dos 22 genes de virulência nas cepas de *Pasteurella multocida* detectados por PCR conforme o hospedeiro de origem.

Processo ou enzima	Gene	Frequências absoluta e relativa (%) - cepas de aves (n=56)	Frequências absoluta e relativa (%) - cepas de suínos (n=40)
Proteínas de membrana externa	<i>ompH</i>	54 (96,4)	39 (97,5)
	<i>oma87</i>	56 (100)	40 (100)
	<i>ompA</i>	34 (60,7)	38 (95)
	<i>plpB</i>	55 (98,2)	39 (97,5)
	<i>psl</i>	54 (96,4)	39 (97,5)
Metabolismo do ferro	<i>exbD-tonB</i>	55 (98,2)	39 (97,5)
	<i>fur</i>	54 (96,4)	39 (97,5)
	<i>hgbA</i>	55 (98,2)	37 (92,5)
	<i>hgbB</i>	52 (92,9)	23 (57,5)
Sialidases	<i>nanH</i>	53 (94,6)	34 (85)
	<i>nanB</i>	55 (98,2)	40 (100)
Superóxido dismutases	<i>sodA</i>	54 (96,4)	40 (100)
	<i>sodC</i>	54 (96,4)	40 (100)
Sintetase do ácido hialurônico	<i>pmHAS</i>	49 (87,5)	37 (92,5)
Toxina dermonecrótica	<i>toxA</i>	0 (0)	1 (2,5)
Adesinas	<i>ptfA</i>	54 (96,4)	39 (97,5)
	<i>pfhA</i>	35 (62,5)	21 (52,5)
	<i>tadD</i>	21 (37,5)	34 (85)
	<i>hsf-1</i>	28 (50)	8 (20)
Tipo capsular	<i>hyaD-hyaC</i>	51 (91,1)	37 (92,5)
	<i>dcbF</i>	3 (5,4)	3 (7,5)
	<i>bcbD</i>	0 (0)	0 (0)

A distribuição semelhante de alguns genes neste trabalho, independentemente da origem ou do sorogrupo de *P. multocida*, pode sugerir a seleção de fatores que apresentem proteção cruzada como candidatos ao desenvolvimento de vacinas. Como exemplo, as porinas são geralmente proteínas conservadas entre as espécies e são altamente imunogênicas (TABATABAI; ZEHR, 2004; LEE; KIM; KWON, 2007). Entretanto, tais trabalhos com isolados de *P. multocida* geralmente apresentam resultados variáveis na proteção dos animais (WU *et al.*, 2007; AHMAD *et al.*, 2014).

A análise dos grupos de genes conforme a função ou processo associado indica que os genes codificantes de proteínas de membrana externa (*ompH*, *oma87*, *psl*, *plpB*) foram detectados em uma frequência superior a 90%, tanto entre as cepas de origem aviária quanto entre aquelas de origem suína. Contudo, o gene *ompA* foi detectado em 61% das cepas aviárias, sendo sua ocorrência significativamente menor ($p < 0,05$) do que a observada para os outros genes do mesmo grupo.

A habilidade dos microrganismos patogênicos em obter o ferro consiste em uma característica primordial durante o processo infeccioso (RATLEDGE; DOVER, 2000). A aquisição de ferro representa um importante papel na sobrevivência e na patogenicidade de *P. multocida* no hospedeiro (MAY *et al.*, 2001). Os genes *exbD-tonB*, *hgbA* e *fur* não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), e a frequência encontrada também está de acordo com outros estudos (EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009). Estes genes estão envolvidos, respectivamente, com a energia necessária para suprir o metabolismo, assim como com a captação de ferro a partir da hemoglobina e com a regulação da transcrição de genes envolvidos no processo (PAUSTIAN *et al.*, 2002; COX *et al.*, 2003; KREWULAK; VOGEL, 2008). Contudo, *hgbB* apresentou uma frequência significativamente menor (57,5%) do que os demais genes envolvidos com o metabolismo do ferro nos isolados de origem suína ($p < 0,001$). Esta situação já havia sido observada com a padronização do protocolo de multiplex-PCR em 2011 no CDPA (FURIAN, 2011). Bethe *et al.* (2009) detectaram o gene em menor frequência em suínos doentes do que em saudáveis, assim como Shayegh, Atashpaz e Hejazi (2008) que trabalharam com cepas de ovinos. Em ambas as situações, acredita-se não haver relação entre a presença de *hgbB* e as doenças causadas por *P. multocida* nestas espécies. Da mesma forma, a frequência do gene *hgbB*, que codifica uma proteína que se liga à hemoglobina, foi superior àquela observada por Ewers *et al.* (2006) para as cepas aviárias. A existência de duas proteínas - HgbA e HgbB - que conferem a mesma habilidade em adquirir o ferro do hospedeiro, assim como observado em outras espécies da família *Pasteurellaceae*, podem resultar no aumento da captação deste elemento e na proteção do patógeno contra efeitos negativos da mutação em um dos genes codificantes (EWERS *et al.*, 2006).

A maior variação na frequência gênica foi observada entre as adesinas. O gene *ptfA* que codifica uma subunidade da fímbria do tipo IV foi significativamente mais frequente nos dois hospedeiros ($p < 0,05$) em relação aos genes *pfhA* e *hsf-1*, codificantes, respectivamente, de uma hemaglutinina filamentosa e de uma adesina de autotransporte (HATFALUDI *et al.*, 2010). Também a frequência do gene *pfhA* apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao gene *tadD* nos dois hospedeiros. Enquanto *pfhA* foi mais frequente do que *tadD* em cepas aviárias, o inverso foi observado na análise dos isolados de suínos. Por outro lado, uma diferença significativa ($p < 0,05$) na ocorrência de *tadD* em relação ao gene *hsf-1* somente foi constatada nas cepas isoladas de suínos. 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).

A variação na ocorrência dos genes relacionados, independentemente da origem das cepas, deve-se provavelmente a gama de proteínas com funções similares que a bactéria apresenta (HATFALUDI *et al.*, 2010). Com exceção ao gene *ptfA* que codifica uma subunidade da fímbria do tipo IV, a qual é encontrada em vários gêneros bacterianos e apresenta alto grau de similaridade a outras fímbrias (DOUGHTY; RUFFOLO; ADLER, 2000; HATFALUDI *et al.*, 2010), os demais genes analisados apresentaram uma frequência inferior a 65%. A fímbria do tipo 4 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).

A cápsula é o principal fator de virulência identificado em *P. multocida* (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006). Os genes *hyaD-hyaC*, *dcbF* e *bcbD* estão relacionados com a biossíntese capsular dos sorogrupos A, D e B, respectivamente (TOWNSEND *et al.*, 2001). Entre as cepas de origem aviária e suína, mais de 90% delas foram classificadas no sorogrupo A. Em ambos os hospedeiros, houve diferença significativa na presença de *hyaD-hyaC* em relação ao gene *dcbF* ($p < 0,05$).

O tipo A, identificado em 91% das cepas aviárias, é predominante em casos de CA (CHUNG *et al.*, 2001) e resultados semelhantes foram observados em outras pesquisas (LEOTTA *et al.*, 2006a; SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; JABBARI; ESMAELZADEH; MOAZENI JULA, 2006; MOHAMED *et al.*, 2012; ESPINOSA; BAEZ; VICHI, 2012; VARGA *et al.*, 2013).

Nenhuma cepa foi classificada no tipo capsular B, o qual também está presente em aves, assim como o F. A ocorrência destes sorogrupos é considerada rara (GLISSON, 2008). No estudo de Davies, Maccorquodale e Caffrey (2003b) somente 8% das cepas isoladas em aves foram pertencentes ao tipo B, 5% ao sorogrupo D e 4% ao tipo F. Da mesma forma, o tipo capsular A também foi predominante entre os isolados de suínos, o qual demonstra prevalência variável em casos de doenças respiratórias conforme a região geográfica estudada (DAVIES; MACCORQUODALE; CAFFREY, 2003b; BETHE *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2011). A maior parte dos estudos detectou a presença de cepas do sorogrupo A, apesar de tanto o

sorogrupo A quanto D estarem associados com os casos de pneumonia em suínos (DAVIES *et al.*, 2003a).

Por último, os genes codificantes de siliadasas (*nanH*, *nanB*), de dismutases (*sodA*, *sodC*) e da sintetase do ácido hialurônico (*pmHAS*) também apresentaram uma frequência próxima ou superior a 90%. Contudo, as diferenças observadas dentro dos grupos não foram significativas ($p > 0,05$) em ambos os hospedeiros. O gene *toxA*, codificante da toxina dermonecrótica, somente foi detectado em uma cepa isolada de suínos.

5.2.2 Perfis dos genes associados à virulência e dendograma

Conforme a presença ou ausência dos genes analisados, as cepas foram agrupadas em 33 diferentes perfis, sendo que seis foram comuns às cepas isoladas de aves e de suínos (APÊNDICE F). O perfil 1 (*toxA*⁻; *pfhA*⁻; *dcbF*⁻; *bcbD*⁻; *hsf-1*⁻), presente em ambos os hospedeiros, foi identificado em 16,7% (16/96) das cepas e foi o mais frequente. O perfil de cada cepa de origem aviária e suína analisada conforme as frequências dos genes pesquisados constam no APÊNDICE G e no APÊNDICE H, respectivamente. A classificação em perfis permite uma análise qualitativa dos resultados, considerando apenas a presença ou a ausência dos genes e estabelecendo uma relação linear entre as cepas.

A análise de dendrograma, considerando-se a presença ou a ausência dos 22 genes de virulência entre os 96 isolados de *P. multocida*, consta no APÊNDICE I. O procedimento hierárquico da ligação média ou método UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*) e os valores calculados da distância de Gower foram realizados para o agrupamento das cepas e para a criação do dendrograma (GOWER, 1971; JOHNSON; WICHERN, 2007). A adequabilidade de cada dendrograma foi avaliada, obtendo-se um valor cofenético de 0,890, e o número ótimo de subgrupos foi definido pelo método *Dynamic Tree Cut* (LANGFELDER; ZHANG; HORVATH, 2008). Este método indicou que todos os isolados, à exceção das cepas de número 28 e 57, isoladas, respectivamente, de aves e de suínos, estariam em um mesmo grupo (APÊNDICE I). A observação de padrões de distribuição independentemente da origem e com pequenas variações, inclusive com praticamente todas as cepas sendo agrupadas em um mesmo *cluster* pela análise do dendrograma, está provavelmente

associada com a aquisição dos genes de virulência através da evolução e da transmissão horizontal dentro da população de *P. multocida* (TANG *et al.*, 2009).

Assim, baseando-se nesta hipótese e no precedente histórico de outras zoonoses, existe um potencial para qualquer agente patogênico que infecte animais a evoluir para um microrganismo facilmente transmitido às pessoas ou a converter-se em um patógeno específico aos humanos a partir da relação próxima dos hospedeiros (WOLFE; DUNAVAN; DIAMOND, 2007). Atualmente, esta relação é mais íntima se considerarmos o número de animais de companhia e de atividades que interferem nos habitats de vida selvagem (PATZ *et al.*, 2004; WILSON; HO, 2013). Considerando-se a prevalência de *P. multocida* como parte da microbiota de animais domésticos e selvagens, acredita-se que exista um potencial da bactéria para a conversão em um patógeno específico aos humanos a partir da aquisição de fatores de virulência adicionais, além de um envolvimento crescente em casos de zoonose (WILSON; HO, 2013). Logo, a futura caracterização molecular e fenotípica de cepas de *P. multocida* isoladas de lesões de humanos e, especialmente, de cepas de origem felina também consiste em uma etapa importante.

Os perfis de virulência e a classificação como multirresistentes das cepas nos testes de susceptibilidade antimicrobiana não apresentaram associação significativa ($p > 0,05$) dos resultados. Da mesma forma, os índices de patogenicidade das cepas obtidos em experimentação *in vivo* não apresentaram relação com as cepas multirresistentes. A resistência antimicrobiana e a virulência evoluíram em escalas de tempo diferentes, apesar de compartilharem características semelhantes, por exemplo, em ambos os casos a maioria dos determinantes são transmitidos entre as espécies através de transferência horizontal (BECEIRO *et al.*, 2013). As bactérias patogênicas têm modificado sua virulência para se adaptar aos sistemas de defesa do hospedeiro há milhões de anos. Por outro lado, a evolução e a disseminação de resistência antimicrobiana são eventos relativamente recentes, mais concentrados nos últimos 50 anos, a partir do emprego do primeiro antimicrobiano (BECEIRO *et al.*, 2013).

Resultado semelhante foi constatado por Da Rocha (2012) em trabalho desenvolvido no CDPA com cepas de *E. coli* de origem aviária. As cepas estudadas não apresentaram associação significativa das mesmas variáveis que se comportaram de maneira independente. Contudo, a resistência antimicrobiana é frequentemente associada a fatores de virulência. Um exemplo são as infecções de hospedeiros imunodeprimidos por cepas multirresistentes de espécies oportunistas, como

Pseudomonas aeruginosa, que colonizam novos nichos em que outros microrganismos não poderiam sobreviver devido à pressão antimicrobiana (BECEIRO *et al.*, 2013).

5.2.3 Associação entre genes de virulência e sorogrupos

A Tabela 11 apresenta a associação entre cada um dos genes de virulência estudados com os sorogrupos A e D de *P. multocida*. Apesar de a maioria dos genes de virulência ter apresentado uma distribuição semelhante entre os sorogrupos, alguns foram significativamente associados com um tipo capsular específico. Os genes *toxA* e *hsf-1* estão associados positivamente ao sorogrupo D e os genes *pmHAS* e *pfhA* ao sorogrupo A. Por outro lado, ocorreu uma associação negativa dos genes *pmHAS*, *pfhA* e *tadD* com o sorogrupo D e do gene *hsf-1* com o sorogrupo A.

Tabela 11 - Frequências absoluta e relativa (%) dos genes de virulência detectados através de PCR conforme os sorogrupos A e D das cepas de *Pasteurella multocida* analisadas.

Gene	Sorogrupo A (n=90)	Sorogrupo D (n=6)
<i>ompH</i>	87 (96,7)	6 (100)
<i>ompA</i>	67 (74,4)	6 (100)
<i>plpB</i>	88 (97,8)	6 (100)
<i>psl</i>	88 (97,8)	5 (83,3)
<i>exbD-tonB</i>	88 (97,8)	6 (100)
<i>fur</i>	87 (96,7)	6 (100)
<i>hgbA</i>	86 (95,6)	6 (100)
<i>hgbB</i>	69 (76,7)	6 (100)
<i>nanH</i>	80 (88,9)	6 (100)
<i>nanB</i>	89 (98,9)	6 (100)
<i>sodA</i>	87 (96,7)	6 (100)
<i>sodC</i>	88 (97,8)	6 (100)
<i>pmHAS</i>	88 (97,8)^b	0 (0)^b
<i>toxA</i>	0 (0)	1 (16,7)^a
<i>ptfA</i>	87 (96,7)	6 (100)
<i>pfhA</i>	58 (64,4)^c	0 (0)^c
<i>tadD</i>	55 (61,1)	0 (0)^c
<i>hsf-1</i>	30 (33,3)^b	6 (100)^c

^a indica associação significativa (p<0,05).

^b indica associação significativa (p<0,001).

^c indica associação significativa (p<0,01).

oma87: gene constante em que cálculo de significância não foi realizado.

As supostas propriedades de *pfhA* durante o processo infeccioso são baseadas nas informações fenotípicas da proteína FhaB, estrutura homóloga encontrada em *Bordetella pertussis* (MAY *et al.*, 2001). Esta proteína é transportada à superfície do microrganismo e provavelmente aumenta a dispersão e a colonização bacteriana (LOCHT; ANTOINE; JACOB-DUBUISSON, 2001). Além disto, FhaB é um dos fatores principais na formação e na manutenção da integridade estrutural de biofilmes presentes na região nasal e na traqueia de camundongos (SERRA *et al.*, 2011).

Ao contrário das hemaglutininas, *toxA* apresentou associação positiva ao sorogrupo D neste estudo. O gene *toxA*, codificante da toxina dermonecrótica (PMT-*Pasteurella multocida* toxin), não foi detectado em nenhuma cepa de origem aviária e somente em 2,5% das cepas de suínos. Taxas de ocorrência inferiores a 10% também foram detectadas em suínos com pneumonia em outros estudos (JAMALUDIN *et al.*, 2005; BETHE *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009; VOUGIDOU *et al.*, 2015). Geralmente a PMT está relacionada às lesões ocorridas nos casos de rinite atrófica em suínos, ocasionando a atrofia dos turbinados nasais devido à proliferação descontrolada de osteoclastos e à inibição da diferenciação dos osteoblastos (DAVIES; MACCORQUODALE; CAFFREY, 2003b; BOYCE *et al.*, 2010). Apesar das cepas provenientes de suínos que foram analisadas neste estudo não serem originárias de casos de rinite atrófica, o gene *toxA* está presente tanto no genoma de cepas toxigênicas quanto de isolados não toxigênicos de *P. multocida* (WILSON; HO, 2013) e é derivado de bacteriófagos lisogênicos (PULLINGER; BEVIR; LAX, 2004).

Mesmo que a presença de *toxA* esteja associada a cepas do sorogrupo D (DZIVA *et al.*, 2004), outros trabalhos o detectaram em cepas do sorogrupo A não relacionadas a casos de rinite atrófica e em diferentes hospedeiros (ZAGLIC *et al.*, 2005; SHAYEGH; ATASHPAZ; HEJAZI, 2008; VOUGIDOU *et al.*, 2015). Cepas toxigênicas de *P. multocida* também foram identificadas em humanos (DONNIO *et al.*, 1991), mas o papel da PMT no trato respiratório não foi esclarecido (WILSON; HO, 2013). As moléculas receptoras a esta exotoxina nas células eucarióticas não foram totalmente identificadas, o que futuramente representará importante avanço para a classificação de células sensíveis e resistentes a PMT em diferentes tecidos ou hospedeiros (HORIGUCHI, 2012) e que justifique a sintomatologia somente em espécies definidas.

A associação positiva do gene *hsf-1* e negativa do gene *pmHAS* com o sorogrupo D observada no estudo também foi destacada por Tang *et al.* (2009) na análise de cepas

de *P. multocida* isoladas de suínos. Por outro lado, *pmHAS* foi significativamente mais concentrado no sorogrupo A. A enzima Ácido Hialurônico Sintetase (PmHAS - *hyaluronan synthase*) é uma glicosiltransferase de dupla ação que realiza a adição de unidades alternadas dos ácidos D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina para a formação do ácido hialurônico que compõe majoritariamente a cápsula do tipo A (DeANGELIS *et al.*, 1998; BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000b).

Além da alta frequência observada para a maioria dos genes estudados, houve uma associação significativa na presença conjunta dos genes de virulência em 45 situações, conforme demonstram os resultados na Tabela 12.

Tabela 12 - Ocorrência (%) dos genes de virulência aos pares para as 96 cepas de *Pasteurella multocida* analisadas.

	<i>ompH</i>	<i>toxA</i>	<i>ptfA</i>	<i>nanH</i>	<i>exbD-tonB</i>	<i>sodA</i>	<i>pfhA</i>	<i>hgbA</i>	<i>sodC</i>	<i>nanB</i>	<i>hgbB</i>	<i>oma87</i>	<i>hsf-1</i>	<i>fur</i>	<i>pmHAS</i>	<i>psl</i>	<i>ompA</i>	<i>plpB</i>	<i>tadD</i>	
<i>ompH</i>	100																			
<i>toxA</i>	1	100																		
<i>ptfA</i>	97	1	100																	
<i>nanH</i>	93*	100	90	100																
<i>exbD-tonB</i>	100*	100	98	100*	100															
<i>sodA</i>	98	100	98	99	98	100														
<i>pfhA</i>	58	0	57	60	59	59	100													
<i>hgbA</i>	96	100	96	99*	96	96	100*	100												
<i>sodC</i>	99	1	98	99	99*	98	100	98	100											
<i>nanB</i>	100*	100	99	100	100*	99	100	99	100*	100										
<i>hgbB</i>	78	100	78	80	78	78	77	82*	78	78	100									
<i>oma87</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>hsf-1</i>	36*	100	38	33*	36	37	38	35*	36	37	42	38	100							
<i>fur</i>	99*	100	97	99*	99*	97	96	97	98	98*	96	97	92*	100						
<i>pmHAS</i>	90	0	90	89	89	89	98*	90	89	90	87	90	78*	90	100					
<i>psl</i>	99*	100	97	99*	99*	97	98	97	98	98*	96	97	92*	99*	98	100				
<i>ompA</i>	77*	100	76	76*	44	75	63*	74	77	76	68*	75	39**	77*	73	76	100			
<i>plpB</i>	100*	100	98	100*	100**	98	98	98	99	99*	97	98	94	100*	98	100*	100	100		
<i>tadD</i>	60	0	58	57*	59	56	48*	55	59	58	45**	57	28*	59*	62*	59	74*	59	100	

* indica associação significativa ($p < 0,05$).

** indica associação significativa ($p < 0,001$).

Associação de *hyaD-hyaC* e *dcfF* com demais genes é apresentada na Tabela 11.

Todos os genes, com exceção de *tadD*, apresentaram associação significativa ($p < 0,05$) com ambos hospedeiros - aves e suínos. Neste caso não podem ser utilizados como marcadores específicos a uma determinada espécie, apesar de alguns genes de virulência serem associados a determinadas espécies animais, como o gene *tbpA* que foi exclusivamente detectado em ruminantes por Ewers e colaboradores em 2006. Em recente levantamento realizado no laboratório também não foi detectada a presença do gene *tbpA* nas cepas aviárias, suínas ou de origem desconhecida pertencentes à bacterioteca do CDPA (dados não publicados).

5.2.4 Comparação dos resultados de tipificação dos sorogrupos A e D através dos testes fenotípicos e do multiplex-PCR

A classificação dos sorogrupos de *P. multocida* através dos testes comparados apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na capacidade de tipificação, conforme demonstram os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Tipificação capsular de 54 cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.

Análise	Sorogrupo			Total (%)
	A (%)	D (%)	NT* (%)	
Multiplex PCR	49 (90,7) ^a	3 (5,6) ^a	2 (3,7) ^a	54 (100)**
Testes fenotípicos não sorológicos	41 (75,9) ^b	2 (3,7) ^a	11 (20,4) ^b	54 (100)**

*NT: não tipificável.

** As cepas ATCC 12945 e 15742 foram selecionadas como controles positivos dos testes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 14 - Tipificação capsular das 40 cepas de *Pasteurella multocida* de origem suína através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.

Análise	Sorogrupo			Total (%)
	A (%)	D (%)	NT* (%)	
Multiplex PCR	37 (92,5) ^a	3 (7,5) ^a	0 (0)**	40 (100)
Testes fenotípicos não sorológicos	29 (72,5) ^b	7 (17,5) ^b	4 (10)	40 (100)

*NT: não tipificável.

** variável constante.

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Entre as cepas isoladas de casos de CA, 90,7% (49/54) foram classificadas no sorogrupo A através do multiplex-PCR e apenas 3,7% delas (2/54) não foram classificadas em um dos dois sorogrupos (Tabela 13). Em contraste, somente 75,9% (41/54) das cepas aviárias foram identificadas no tipo capsular A através do teste da hialuronidase e 20,4% (11/54) não foram tipificadas. A ocorrência do sorogrupo D foi baixa em ambos os testes e não houve diferença significativa nos resultados obtidos ($p>0,05$). Apenas 5,6% (3/54) das cepas isoladas de aves foram classificadas no tipo capsular D através do multiplex-PCR e 3,7% (2/54) com o uso do teste da acriflavina (Tabela 13). Resultados semelhantes também foram observados entre os isolados de origem suína (Tabela 14).

A comparação dos testes fenotípicos não sorológicos com o multiplex-PCR revelou uma importante variação na capacidade de tipificação, também observada em outras pesquisas (SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; ARUMUGAN *et al.*, 2011). Atualmente, o método molecular é considerado por alguns autores a técnica padrão ouro para a tipificação capsular, substituindo os métodos convencionais, especialmente o teste da hemaglutinação indireta (DZIVA *et al.*, 2008). A falha na aglutinação dos sorogrupos A, D e F com os antissoros homólogos consiste em uma das principais causas para a redução da sensibilidade dos testes fenotípicos (JABBARI; ESMAELZADEH; MOAZENI JULA, 2006).

Além disto, o teste de hemaglutinação indireta desenvolvido por Carter em 1955 pode tornar-se ineficaz devido à perda da cápsula de *P. multocida* após sucessivos cultivos *in vitro* (DZIVA *et al.*, 2008). Algumas cepas não são capsuladas, logo não são tipificáveis. No estudo desenvolvido por Shivachandra *et al.* (2006) comparando ambos os métodos, 16% dos 123 isolados de diferentes espécies aviárias analisados não foram identificados através dos testes convencionais. Por outro lado, 100% das cepas foram tipificadas através do multiplex PCR. Similarmente, Arumugan *et al.* (2011) observaram que 48% das cepas provenientes de diversas espécies animais não foram tipificadas através dos testes da hialuronidase e da acriflavina ou com o emprego de antissoros específicos para os sorogrupos A, D e B.

Neste estudo, 3,7% (2/56) das cepas de CA não foram identificadas através do multiplex-PCR adaptado a partir do protocolo proposto por Townsend e colaboradores em 2001. Os autores relatam que de 2 a 5% das cepas geralmente não são tipificáveis. Em outros trabalhos, entre 2 a 9% das cepas não foram classificadas em nenhum dos sorogrupos (DZIVA *et al.*, 2004; JAMALUDIN *et al.*, 2005; LEOTTA *et al.*, 2006a).

De maneira semelhante, também não foi tipificada uma cepa de CA entre as 25 utilizadas para a adaptação do protocolo no laboratório em 2011 (FURIAN *et al.*, 2011). Apesar da ocorrência rara, os poucos isolados não identificados poderiam pertencer ao sorogrupo F, para o qual não houve análise no estudo. O sorogrupo F, originalmente isolado de perus, também já foi detectado em cepas de *P. multocida* originárias de bovinos e de gatos (EWERS *et al.* 2006). Conforme Davies, Maccorquodale e Caffrey (2003b), estas cepas, menos frequentes em aves, estão associadas com os casos de sinusite e conjuntivite nos animais.

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). Além da relação específica a determinadas doenças e espécies, também existe uma distribuição geográfica dominante dos tipos capsulares (ZAGLIC *et al.*, 2005). Contudo, estas relações têm apresentado variações nos últimos anos (BOROWSKI *et al.*, 2007; DZIVA *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2011; KATOCH *et al.*, 2015). Estes levantamentos são raros no Brasil, especialmente com cepas de *P. multocida* isoladas de aves.

De acordo com o percentual de concordância simples, 70,4% (38/54) das cepas aviárias e 80% (32/40) das cepas de origem suína foram classificadas no mesmo sorogrupo através dos testes fenotípicos e do multiplex-PCR (Tabela 15 e Tabela 16).

Tabela 15 - Comparação dos resultados de tipificação capsular de 54 cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.

	Sorogrupo	Multiplex PCR			Total
		A	D	NT*	
Testes fenotípicos não sorológicos	A	37	3	1	41
	D	2	0	0	2
	NT*	10	0	1	11
	Total	49	3	2	54

Percentual de concordância simples: 70,4%.

Coefficiente kappa (k): 0,017 (0,062 - 0,212).

*NT: não tipificável.

Tabela 16 - Comparação dos resultados de tipificação capsular das 40 cepas de *Pasteurella multocida* de origem suína através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR.

	Sorogrupo	Multiplex PCR			Total
		A	D	NT*	
Testes fenotípicos não sorológicos	A	29	0	0	29
	D	4	3	0	7
	NT*	4	0	0	4
	Total	37	3	0	40

Percentual de concordância simples: 80%.

Coefficiente kappa (k): 0,368 (0,178 - 0,673).

*NT: não tipificável.

Entre os isolados tipificados, os dois testes apresentaram classificações divergentes em 9,3% (5/54) das cepas aviárias e em 10% (4/40) das cepas suínas, também citadas em outras pesquisas (EWERS *et al.*, 2006; ARUMUGAN *et al.*, 2011). A composição química semelhante dos polissacarídeos que compõem as cápsulas, independentemente do sorogrupo, pode interferir na especificidade dos testes fenotípicos (EWERS *et al.*, 2006). A dificuldade em se obter antissoros específicos, assim como a necessidade de isolamento e de tipificação dos isolados clínicos nos estágios iniciais da infecção ou anteriormente ao desenvolvimento de vacinas homólogas para CA são importantes justificativas para o uso do método molecular (SHIVACHANDRA *et al.* 2006; DZIVA *et al.*, 2008). Além disto, o teste é menos laborioso e permite a identificação simultânea dos diferentes sorogrupos de *P. multocida* (TOWNSEND *et al.*, 2001; DZIVA *et al.*, 2008).

O coeficiente kappa (k) calculado foi de 0,017 para as cepas aviárias e de 0,368 para os isolados suínos e indicam, respectivamente, uma concordância pobre e moderada entre os dois métodos (LANDIS; KOCH, 1977). Este resultado é justificado pela alta frequência do sorogrupo A entre as cepas analisadas em ambos os hospedeiros, o que interfere no cálculo do coeficiente k (LANDIS; KOCH, 1977).

5.2.5 Tipabilidade e poder discriminatório dos protocolos de PCR-RFLP

O PCR-RFLP a partir da amplificação do gene *ompH* permitiu a classificação dos 56 isolados de origem aviária em sete grupos moleculares, sendo os grupos II e V os predominantes, conforme descrito na Tabela 17.

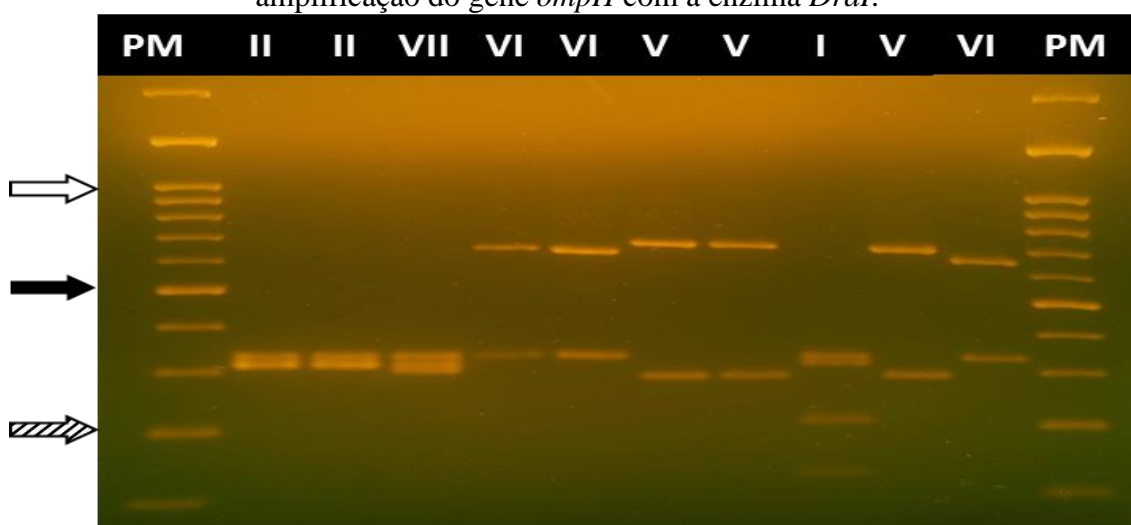
Tabela 17 - Grupos moleculares das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária obtidos no PCR-RFLP a partir da análise de um fragmento do gene *ompH* e da digestão com as endonucleases de restrição *DraI* e *HindIII*.

Grupo	Fragmentos (pb)	Frequência absoluta e relativa (%) (n=56)
I	131, 216, 314 337	7 (2,5)
II	314, 317, 337	24 (42,9)
III*	225, 750	2 (3,6)
IV*	430, 530	2 (3,6)
V	290, 693	10 (17,9)
VI	337, 631	5 (8,9)
VII	305, 314, 317	6 (10,7)

*grupos gerados a partir da clivagem com a enzima de restrição *HindIII*.

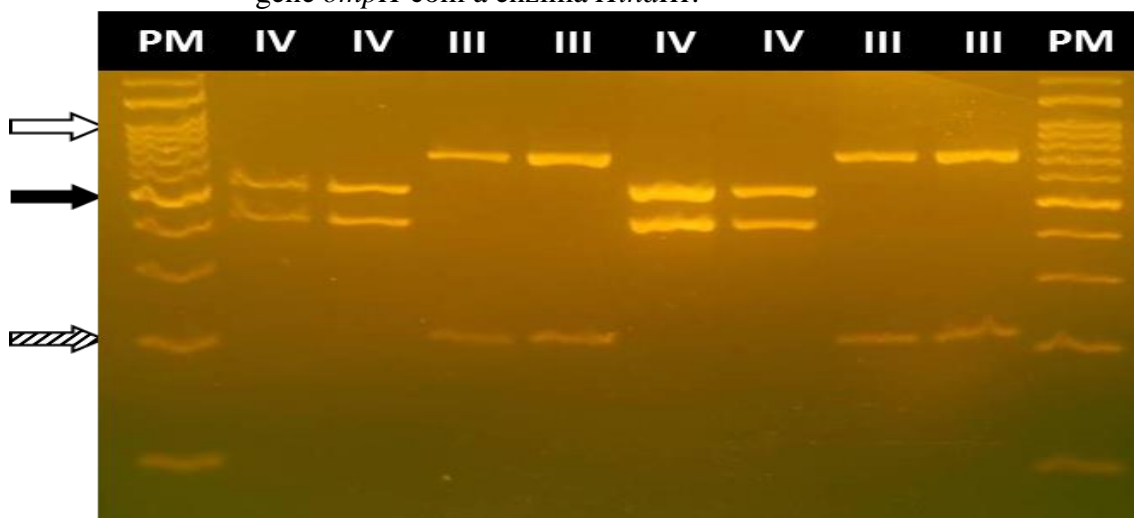
Os perfis I, II, V, VI e VII foram obtidos através da digestão com a enzima *DraI* (Figura 1), enquanto os grupos III e IV não foram clivados pela primeira enzima e somente foram distinguidos através da clivagem pela endonuclease de restrição *HindIII* (Figura 2).

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo com os grupos gerados (I, II, V, VI, VII) das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária a partir da clivagem do produto de amplificação do gene *ompH* com a enzima *DraI*.



Legenda: PM= marcador de peso molecular (100 pb). Seta tracejada= fragmento de 200 pb, seta preenchida= fragmento de 500 pb, seta branca= fragmento de 1000 pb.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo com os grupos gerados (III, IV) das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária a partir da clivagem do produto de amplificação do gene *ompH* com a enzima *HindIII*.



Legenda: PM= marcador de peso molecular (100 pb). Seta tracejada= fragmento de 200 pb, seta preenchida= fragmento de 500 pb, seta branca= fragmento de 1000 pb.

A seleção do gene *ompH* para o desenvolvimento do protocolo de PCR-RFLP demonstrou ser eficiente quanto à identificação de polimorfismos entre os isolados de *P. multocida* de origem aviária através do agrupamento de 100% das cepas em sete padrões distintos. Outras pesquisas baseadas na análise e na discriminação do gene *ompH* também apresentaram resultados semelhantes. Em 2005, Jabbari e Esmaelizadeh realizaram a amplificação de um fragmento do gene *ompH* e a posterior digestão com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *CfoI*, conseguindo classificar 25 isolados de *P. multocida* de origem aviária em cinco diferentes perfis. Sellyei, Ivanics e Magyar (2013) identificaram oito perfis entre 60 isolados de origem aviária com a amplificação de uma região variável do mesmo gene e a clivagem com as enzimas *DraI*, *HindIII* e *PvuII*. No Brasil, Borowski *et al.* (2002b) identificaram sete padrões em 22 cepas isoladas do pulmão de suínos na análise de *ompH* através do emprego das endonucleases de restrição *AluI*, *Sau3AI*, *DdeI*, *HinfI* e *RsaI*.

Por outro lado, o protocolo de PCR-RFLP a partir da amplificação do gene *oma87* e do emprego das mesmas endonucleases de restrição originou um único grupo para todas as cepas aviárias com fragmentos de 174, 350 e 424 pb. Apesar da possibilidade de que todas as cepas testadas sejam pertencentes ao mesmo perfil através deste protocolo, a técnica não apresentou poder discriminatório suficiente. O protocolo

foi padronizado utilizando-se *primers* desenhados para a detecção de *oma87* em estudo sobre a prevalência de fatores de virulência em *P. multocida* (TANG *et al.* 2009). Uma hipótese é que a região do gene selecionada não proporcione alto poder discriminatório para técnicas de tipificação molecular (BRUISTEN; SCHOULS, 2010).

A utilização do PCR-RFLP é simples e executável conforme as condições e os equipamentos existentes no nosso laboratório. A disponibilidade de uma ferramenta para a investigação epidemiológica de uma enfermidade que acomete diferentes espécies de aves e que apresenta várias fontes de contaminação, como por exemplo, as aves aquáticas (GLISSON, 2008; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009), é fundamental. Os resultados satisfatórios do PCR-RFLP proporcionam uma valiosa ferramenta para a tipificação molecular de *P. multocida* (VOUDIGOU *et al.*, 2015). Neste sentido, Christensen, Dietz e Bisgaard (1998) observaram que os surtos ocorridos em aves aquáticas e galinhas de fundo de quintal foram causados pelo mesmo clone de *P. multocida*, através do emprego de ribotipagem e de enzimas de restrição. Utilizando-se a PFGE, outro estudo relatou o parentesco genético das cepas isoladas de surtos em gansos e perus em regiões geográficas próximas na Hungria (KARDOS; KISS, 2005).

A diversidade de clones responsáveis pela ocorrência de surtos de CA apresenta resultados variáveis. Enquanto alguns trabalhos relatam surtos causados por múltiplos clones da bactéria (RHOADES; RIMLER; BAGLEY, 1992; MUHAIRWA; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000; SINGH *et al.*, 2013), outros reforçam a estabilidade clonal de cepas de origem aviária ao longo do tempo na ocorrência de casos clínicos reincidentes (ZHANG *et al.*, 2004; EIGAARD *et al.*, 2006). Esta questão, que relaciona a estabilidade do agente no ambiente e fontes de contaminação dos lotes aviários, consiste em um objetivo importante a ser analisado em projetos futuros através da adoção do protocolo de PCR-RFLP desenvolvido.

Também a caracterização molecular dos isolados de suínos consiste em uma interessante etapa futura a ser realizada, pois a maioria das infecções em aves, ovinos, bovinos e em suínos é causada por diferentes clones de *P. multocida* associados especificamente a cada hospedeiro (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; VOUDIGOU *et al.*, 2015). Por outro lado, a presença de um menor número de cepas fortemente relacionadas em mais de um hospedeiro sugere que a transmissão destas entre diferentes espécies é um fator a ser considerado na população de *P. multocida* (DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004).

Além disto, algumas proteínas de membrana externa, como *ompH*, são consideradas imunogênicas e foram selecionadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas (AHMAD *et al.*, 2014). Assim, a correlação entre determinados grupos moleculares com as espécies animais representa um avanço para o desenvolvimento de vacinas específicas a cada hospedeiro (VOUDIGOU *et al.*, 2015).

As técnicas de tipificação baseadas no emprego de PCR geralmente são viáveis com uma pequena quantidade de DNA do gene alvo. Entretanto, o cultivo primário torna-se necessário para a obtenção da quantidade suficiente de DNA do microrganismo na maioria das situações em que se utiliza o PCR-RFLP (BRUISTEN; SCHOULS, 2010). Por outro lado, em algumas situações em que a cultura é complexa ou em que o isolamento a partir de amostras clínicas pode ser dificultado pelo crescimento da microflora do hospedeiro, como no caso de *P. multocida*, o PCR-RFLP pode ser a única opção para a caracterização do microrganismo (DZIVA *et al.*, 2008; BRUISTEN; SCHOULS, 2010). No estudo, o DNA extraído foi obtido de amostras puras da bactéria. Assim, a avaliação futura da eficiência da técnica frente a amostras de campo consiste em um interessante objetivo para se diminuir o tempo de diagnóstico.

Os dois protocolos apresentaram 100% de tipabilidade (T) das amostras. O valor T de um método consiste no percentual de estirpes bacterianas tipáveis ou positivas a partir de uma interpretação clara dos resultados (BARTH; NUNES; BAETHGEN, 2012). Contudo, o índice de diversidade de Simpson ou poder discriminatório (D) do PCR-RFLP a partir do gene *ompH* foi de 0,76 e do gene *oma87* igual a 0, pois somente um grupo ou tipo foi observado. O valor D indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocados em diferentes grupos ou tipos (BARTH; NUNES; BAETHGEN, 2012).

Apesar da maioria dos estudos de tipificação molecular disponíveis na literatura, incluindo-se àqueles com *P. multocida*, restringirem-se à descrição do número de perfis gerados e à frequência de cepas inseridas em cada grupo, a determinação do poder discriminatório torna-se importante para a comparação dos protocolos desenvolvidos (HUNTER; GASTON, 1998). A facilidade do emprego do índice de diversidade de Simpson (D) consiste em uma vantagem de aplicação, especialmente para laboratórios que não são centros de referência nacional (BLACKALL; MIFLIN, 2000).

No estudo, o índice D do PCR-RFLP a partir do gene *ompH* foi semelhante ao obtido por Borowski (2001). Assim, se duas cepas forem aleatoriamente selecionadas na população alvo, interpreta-se que em 76% dos casos elas serão classificadas em

diferentes grupos ou tipos. Segundo Hunter e Gaston (1998), índices superiores a 0,9 são considerados desejáveis. O menor índice observado no estudo é resultante da distribuição majoritária das cepas no grupo II, a qual influenciou negativamente no valor obtido, apesar da diversidade de perfis gerados. A obtenção de um maior número de cepas, especialmente de regiões geográficas diferentes, também consiste em uma etapa futura importante para a comparação dos valores do índice D.

5.2.5.1 Associação dos grupos do PCR-RFLP com biovars, sorogrupos e índices de patogenicidade

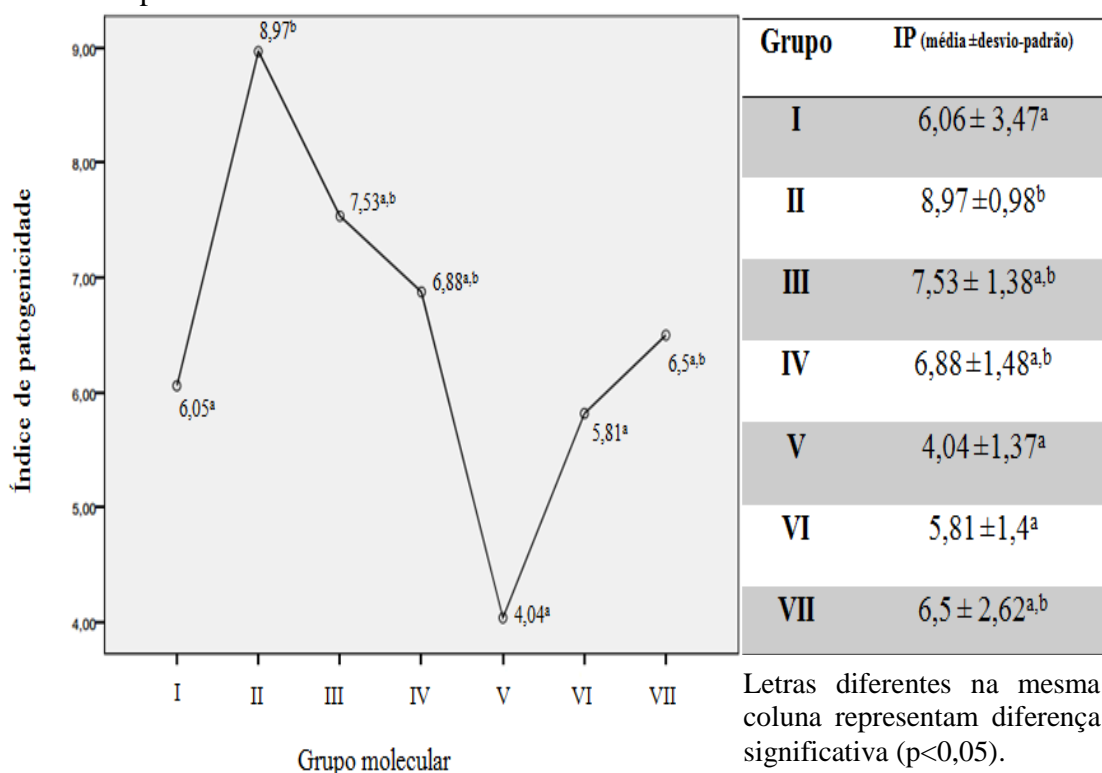
O grupo molecular VII do PCR-RFLP a partir do gene *ompH* apresentou associação significativa ($p < 0,05$) com o biovar 13, identificado através dos testes fenotípicos e considerado uma variante do biovar 3 (BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997). Em 2000, Bowles e colaboradores observaram que a maioria dos isolados de suínos na Austrália classificados em determinados biovars, naquele caso nos tipos 2 e 3, também foram incluídos em diferentes *clusters* através de ribotipagem. Também Garcia *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes ao trabalho de Bowles *et al.* (2000) utilizando a técnica de PFGE. Esta associação indicaria uma separação genética dos isolados de diferentes *clusters* conforme os biovars identificados e que poderia ser o resultado da transferência horizontal de genes ou da evolução independente de linhagens de cepas distintas (DAVIES *et al.*, 2003a; BETHE *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2011).

Não houve associação significativa ($p > 0,05$) dos grupos do PCR-RFLP com os demais biovars relacionados e com os sorogrupos A, D ou de cepas em que o tipo capsular não tenha sido identificado. Dziva *et al.* (2001) também não constataram relação entre os padrões gerados na tipificação molecular através da técnica de RAPD e os sorogrupos de *P. multocida* em pesquisa desenvolvida na África, assim como El Tayeb, Morishita e Angrick (2004) nos Estados Unidos. Tais associações são descritas em estudos que analisam o perfil de migração em eletroforese da proteína OmpH (VASFI MARANDI; HAREL; MITTAL, 1997; DAVIES; MACCORQUODALE; CAFFREY, 2003b) e consideram os tipos gerados marcadores individuais de diferentes clones de *P. multocida* (DAVIES; MACCORQUODALE; CAFFREY, 2003b). Esta relação também é citada para outras proteínas de membrana externa, como OmpA. Recentemente, Voudigou e colaboradores (2015) não observaram correlação entre os

tipos capsulares, os grupos moleculares gerados a partir de *ompA* e a presença ou ausência do gene *toxA*. Por outro lado, cepas representativas de um dos *clusters* gerados foram exclusivamente associadas com o sorogrupo D no mesmo trabalho (VOUDIGOU *et al.*, 2015).

Os grupos moleculares também foram relacionados aos índices de patogenicidade dos isolados de origem aviária resultantes da inoculação experimental de *P. multocida* em pintos por Pilatti (2014) e descritos no APÊNDICE D. As cepas do grupo molecular II apresentaram o maior índice de patogenicidade com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos índices dos grupos I, V, VI, conforme demonstrado no Gráfico 3. Contudo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) do IP do grupo II em relação aos tipos moleculares III, IV e VII.

Gráfico 3 - Distribuição das cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária conforme os grupos moleculares obtidos através do PCR-RFLP e os índices de patogenicidade (IP) calculados a partir da inoculação experimental de pintos.



Apesar de as cepas que constam no grupo II apresentarem o maior índice de patogenicidade, o valor somente diferiu significativamente do IP de três dos demais grupos. Em 2005, Jabbari e Esmaelizadeh constataram uma considerável diversidade genética entre as cepas analisadas e associaram os perfis conforme a apresentação de

CA na forma crônica ou aguda, embora a relação exata entre os grupos do PCR-RFLP e as características fenotípicas, como a patogenicidade, não terem sido determinadas. Da mesma forma, Davies, Maccorquodale e Reilly (2004) não observaram correlação entre os perfis de migração da proteína OmpH de cepas isoladas de suínos e a presença de doença, por exemplo, de pneumonia, nos animais analisados. Assim, os resultados obtidos em testes de tipificação molecular são um primeiro passo para uma investigação mais detalhada sobre as propriedades patogênicas de subgrupos de microrganismos (BRUISTEN; SCHOULS, 2010). Embora alguns grupos neste estudo indiquem a existência de cepas mais virulentas, futuramente os resultados de tipificação necessitam ser interpretados em conjunto com o contexto clínico e epidemiológico (BELKUM *et al.*, 2007).

Além da discriminação das cepas isoladas em padrões, alguns estudos também relacionam os grupos provenientes do PCR-RFLP com os 16 sorotipos somáticos identificados através do teste de ágar gel precipitação desenvolvido por Heddleston, Gallagher e Rebers (1972), o qual é laborioso e efetuado somente em alguns centros de referência (ANTONY *et al.*, 2007; DZIVA *et al.*, 2008; HARPER *et al.*, 2015). O esquema de Heddleston também pode falhar na tipificação das cepas e não apresentar acurácia e reprodutibilidade adequadas (SINGH *et al.*, 2013; HARPER *et al.*, 2015).

Assim, as técnicas moleculares poderiam prover uma alternativa à metodologia convencional (ANTONY *et al.*, 2007; GHANIZADEH *et al.*, 2015). Neste sentido, Sellyei, Ivanics e Magyar (2013) constataram que o protocolo de PCR-RFLP padronizado distinguiu o sorotipo A:1, predominante em aves, dos demais, havendo, contudo, uma pequena correlação entre todos os sorotipos e os setes perfis gerados na técnica. Em 2011, TSAI e colaboradores observaram que cepas dos sorotipos 1 e 13 pertenceram a dois grupos restritos em um protocolo a partir da análise da região externa do *core* do LPS, a qual é variável entre os sorotipos (HARPER; BOYCE; ADLER, 2012).

A inclusão de grupos laterais de carboidratos em diferentes sorotipos de *P. multocida* afeta a sensibilidade do soro e a adesão microbiana e, especialmente, resultam na maior variabilidade antigênica da bactéria (KUBATZKY *et al.*, 2012). Assim, a vacinação com bacterinas induz imunidade específica ao LPS de *P. multocida* e, geralmente, em proteção contra o desafio de cepas pertencentes ao mesmo sorovar (BOYCE *et al.*, 2010). Entretanto, ainda nenhuma técnica molecular discrimina todos os

sorotipos de *P. multocida*, assim como ocorre no esquema de classificação dos sorogrupos ou tipos capsulares através de multiplex-PCR (TOWNSEND *et al.*, 2001).

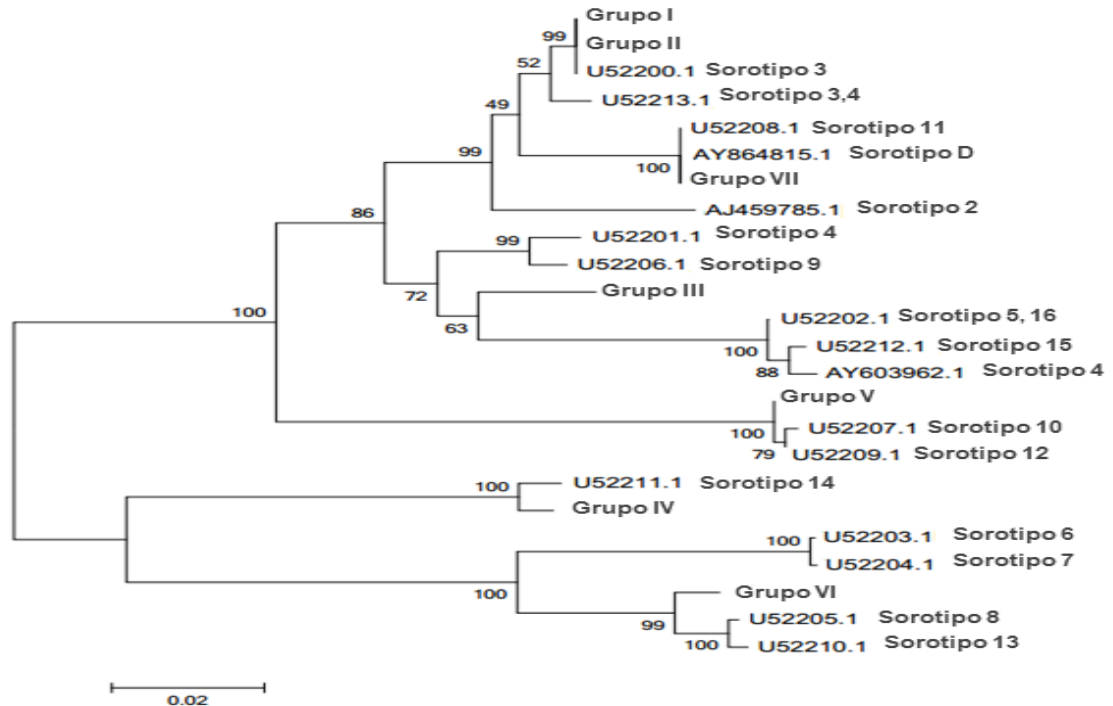
No atual estudo, a associação dos grupos gerados no PCR-RFLP com os sorotipos somáticos não foi realizada, pois é dependente da disponibilidade de antígenos padrão de cada um dos 16 sorotipos identificados através da classificação fenotípica. Entretanto, cepas de cada um dos sete perfis gerados foram selecionadas para sequenciamento e comparação com a sequência nucleotídica de exemplares dos 16 sorotipos de *P. multocida* disponíveis no *GenBank*.

5.2.5.2 Análise do sequenciamento

Três cepas de cada um dos grupos moleculares obtidos através do PCR-RFLP a partir do gene *ompH*, o qual apresentou o maior índice de diversidade de Simpson ou poder discriminatório (D), foram selecionadas aleatoriamente para o sequenciamento. No caso dos tipos III e IV, as duas únicas cepas presentes em cada grupo foram selecionadas. A comparação quanto à similaridade das sequências nucleotídicas do gene *ompH* de cepas de *P. multocida* disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) apresentou uma alta homologia entre os grupos resultantes no PCR-RFLP com diferentes sorotipos da bactéria. A identidade geral entre as sequências analisadas foi de 89,8%. Esta alta identidade geral entre as sequências comprova a natureza conservada de *ompH*, também destacada por Singh *et al.* (2011) em trabalho semelhante realizado.

No atual estudo, também se observou uma maior homologia de cada um dos grupos do PCR-RFLP com as cepas de diferentes sorotipos. A árvore filogenética construída demonstra que os grupos I e II, os quais foram predominantes na classificação das cepas, apresentaram máxima identidade com os sorotipos 3 (100%) e 3-4 (99,1%), respectivamente. Sabidamente, os sorotipos 3 e 3-4 são majoritários nos casos de CA nos Estados Unidos e na Inglaterra (CHRISTENSEN; BOJESSEN; BISGAARD, 2008). Da mesma forma, o grupo III apresentou maior identidade com os sorotipos 9 (97,4%) e 4 (96,8%), o grupo IV com o sorotipo 14 (99,3%), o grupo V com os sorotipos 10 (99,8%) e 12 (99,7%), o grupo VI com os sorotipos 8 (98,5%) e 13 (98,4%) e o grupo VII com o sorotipo 11 (100%) (Figura 3).

Figura 3 - Árvore filogenética demonstrando a relação entre a sequência nucleotídica do gene *ompH* dos grupos moleculares do PCR-RFLP e de cepas de diferentes sorotipos de *Pasteurella multocida*.



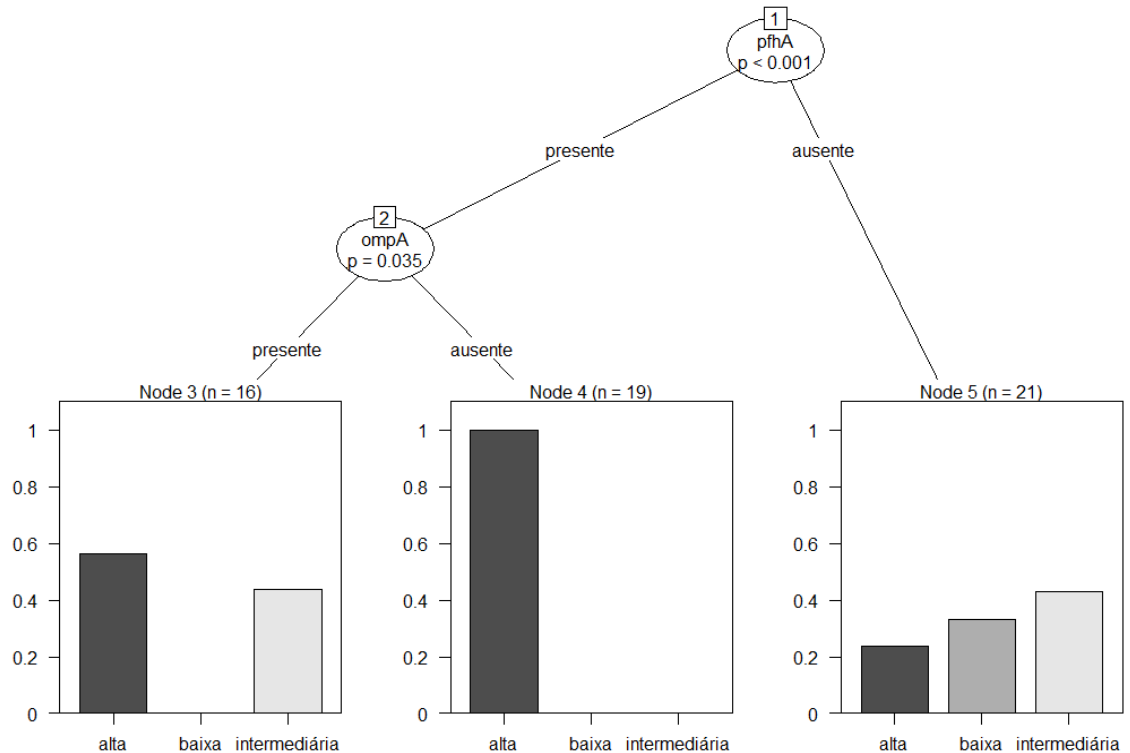
5.3 Identificação de genes marcadores de patogenicidade

O objetivo desta etapa foi pesquisar entre os 22 genes de virulência analisados aqueles que poderiam ser responsáveis por indicar níveis de patogenicidade para cada um dos hospedeiros. Na análise de marcadores em aves, os genes *pfhA*, seguido de *ompA*, foram considerados importantes indicadores dos níveis de patogenicidade (Figura 4).

A ausência do gene *pfhA* indica a presença de cepas de patogenicidade intermediária e, em segundo lugar, de cepas de baixa patogenicidade. Por outro lado, a presença do mesmo gene indica maiores ocorrências de cepas de patogenicidade alta e, em segundo lugar, de cepas intermediárias. Nos casos em que *pfhA* está presente e *ompA* ausente, resulta-se na observação absoluta de patogenicidade alta dos isolados.

Nenhum dos 22 genes de virulência pesquisados foi considerado um marcador para níveis de patogenicidade em suínos.

Figura 4 - Diagrama esquemático da árvore de inferência condicional para determinação de genes indicadores de patogenicidade das 56 cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves.



Legenda: Os grupos de patogenicidade são demonstrados por gráficos de barra. Os valores do eixo vertical indicam proporções. A árvore é determinada ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A patogenicidade consiste na aptidão de um agente em causar doença e resume todas as características de um microrganismo durante a infecção (KUBATZKY, 2012; BECEIRO *et al.*, 2013). Atualmente, nenhuma característica sorológica ou bioquímica e nem a presença de um marcador genético que permita a diferenciação de cepas de *P. multocida* altamente virulentas daquelas de menor virulência isoladas de aves são conhecidas (VARGA *et al.*, 2013).

Apesar dos diversos exemplos de cepas que devido à ausência de fatores apresentam um diferente grau de virulência (KUBATZKY, 2012), a resposta do microrganismo durante o processo infeccioso somente pode ser analisada em estudos com animais (BOYCE *et al.*, 2012). Exemplos são os trabalhos que comparam a resposta transcricional *in vitro* e *in vivo* de uma mesma cepa de *P. multocida* após o isolamento da bactéria do fígado e do sangue de galinhas experimentalmente infectadas (BOYCE *et al.*, 2002; BOYCE *et al.*, 2004). A maioria dos genes que apresentam aumento de transcrição em *P. multocida* está associada com processos metabólicos do

microrganismo (BOYCE *et al.*, 2012). Da mesma forma, as mutações em proteínas relacionadas aos compartimentos externos, como adesinas, e às vias de biossíntese são mais frequentes, logo interferindo na patogenicidade da bactéria (OKAY; KIZILDOĞAN, 2015).

No atual trabalho, o gene *pfhA*, seguido de *ompA*, foram importantes indicadores dos níveis de patogenicidade em aves. A maioria dos patógenos faz uso da toxicidade ou da invasibilidade para ocasionarem as doenças (BECEIRO *et al.*, 2013). O gene *pfhA* codifica hemaglutininas filamentosas que são importantes na invasão e na colonização do trato respiratório superior do hospedeiro (TATUM; YERSIN; BRIGGS, 2005).

Este tipo de análise somente foi possível de ser elaborada após a formulação e o cálculo de um índice de patogenicidade *in vivo* para as cepas (PILATTI, 2014). Assim, as condições do ambiente e do hospedeiro que podem contribuir para a incidência e a severidade de CA (WILSON; HO, 2013) foram iguais para todos os isolados. Ewers *et al* (2006) também observaram associação significativa entre a presença de *pfhA* e a ocorrência de pasteurelose em bovinos, apesar desta análise ter sido realizada a partir das informações sobre o hospedeiro obtidas após o isolamento da bactéria de casos clínicos e de animais saudáveis.

Além disto, Tatum, Yersin e Briggs (2005) e Guo *et al.* (2014) demonstraram que a inativação do gene *pfhA* resulta em atenuação da virulência de cepas de *P. multocida* administradas por via intranasal em perus e em galinhas. O grupo também reportou a proteção de animais desafiados com uma vacina recombinante formulada através da combinação de três fragmentos da porção N-terminal da hemaglutinina (TATUM; TABATABAI; BRIGGS, 2009).

Recentemente, Johnson *et al.* (2013) constaram, através de análise genômica, que a proteína PfhB2, codificada por *pfhA*, apresenta uma similaridade inferior a 90% na comparação das cepas P1059 e X73, virulentas em aves, com a cepa avirulenta Pm70. Os mesmos autores também identificaram uma nova hemaglutinina denominada PfhB4 na cepa P1059 (JOHNSON *et al.*, 2013). Assim, a comparação da sequência nucleotídica de *pfhA* e da similaridade proteica das cepas do atual estudo com os genomas disponíveis na literatura consiste em um futuro objetivo. Da mesma forma, a expressão unicamente do gene *pfhA* deve ser comparada com os distintos índices de patogenicidade obtidos no estudo *in vivo* (PILATTI, 2014).

A presença de *pfhA* e a ausência do gene *ompA* resultou na observação de 100% de cepas com altos índices de patogenicidade no estudo. Apesar de *ompA* influenciar a

relação de *P. multocida* com o hospedeiro, dois alelos do gene que resultam em diferentes níveis de adesão e de invasão de *P. multocida* são observados (KATOCH *et al.*, 2014). Futuramente, a identificação através de sequenciamento dos alelos presentes nas cepas positivas para *ompA* é necessário.

A infecção experimental de animais ainda é considerada o método padrão ouro para avaliação do potencial de virulência dos isolados de *P. multocida* (VARGA *et al.*, 2013). Entretanto, desde a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) em 2008 e das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) nas instituições de ensino e pesquisa, há maior rigor na aprovação dos projetos que utilizam modelos *in vivo* de experimentação. Além disto, as comissões estimulam e avaliam a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e em pesquisa (BRASIL, 2008). O *screening* para a detecção dos 22 genes de virulência e para a inferência através dos modelos de árvores de decisão, comparando-se os índices de patogenicidade formulados, permite a identificação das cepas mais patogênicas de *P. multocida* sem a necessidade da inoculação em animais.

Por outro lado, a detecção do gene *pfhA* marca a presença de isolados de *P. multocida* de maior patogenicidade, mas não é possível a classificação das cepas em grupos de baixa e de intermediária patogenicidade através do atual modelo não-linear empregado. Assim, projeta-se a comparação dos resultados obtidos através do emprego de árvores de decisão no atual trabalho com o uso de redes neurais artificiais, selecionando-se os mesmos dados: a presença dos genes de virulência e a expressão fenotípica *in vivo*. As redes neurais artificiais calculam funções matemáticas normalmente não lineares e estão dispostas em uma ou mais camadas interligadas por um grande número de conexões associadas a determinados pesos ponderados conforme as informações de entrada recebidas (HUANG, 2009). Esta metodologia já foi utilizada em outros projetos com a bactéria *E. coli* no CDPA para a predição dos índices patogenicidade dos isolados (ROCHA, 2006; SALLE *et al.*, 2011).

6 CONCLUSÕES

1. A maioria das cepas de *P. multocida* foi classificada na subespécie *multocida* e no tipo bioquímico ou biovar 3 através da caracterização fenotípica. Mesmo que represente uma informação epidemiológica relacionada ao hospedeiro de origem, a discriminação em subespécies ou em biovars através da fermentação de carboidratos pode apresentar resultados ambíguos, logo a concordância dos dados deve ser comparada futuramente com os resultados de técnicas moleculares.
2. Não foi observada associação entre os índices de patogenicidade obtidos *in vivo* e as subespécies de *P. multocida*, independentemente da origem do hospedeiro. Da mesma forma, os biovars identificados no estudo não foram associados aos genes de virulência pesquisados.
3. A antimicrobianoterapia consiste em uma ferramenta efetiva no tratamento das infecções causadas por *P. multocida*, pois todas as cepas foram sensíveis para no mínimo dois dos antimicrobianos testados. Contudo, a multirresistência observada ratifica a necessidade do uso restritivo e consciente dos antimicrobianos em animais destinados ao consumo humano, além da importância da realização constante dos testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*.
4. A maioria dos genes de virulência apresentou uma alta frequência de detecção nas cepas analisadas. A distribuição gênica semelhante consiste em uma primeira evidência ao desenvolvimento de vacinas para os genes que apresentem proteção cruzada aos diferentes sorotipos da bactéria.
5. No experimento foram obtidos 33 diferentes perfis genéticos e praticamente todas as cepas foram agrupadas em um mesmo *cluster*. A pequena variação entre os perfis está provavelmente associada com a aquisição dos genes de virulência através da evolução e da transmissão horizontal dentro da população de *P. multocida*.
6. Os genes de virulência pesquisados demonstraram não serem específicos a um hospedeiro. Por outro lado, os genes *pfhA* e *pmHAS* foram significativamente associados ao sorogrupo A e os genes *toxA* e *hsf-1* ao sorogrupo D.
7. A maioria das cepas de *P. multocida*, independentemente da origem, foi classificada no sorogrupo A através dos testes fenotípicos não sorológicos e do multiplex-PCR, o qual apresentou uma maior capacidade de tipificação das amostras.
8. A seleção do gene *ompH* para o desenvolvimento do protocolo de PCR-RFLP demonstrou ser eficiente quanto à identificação de polimorfismos entre os isolados de *P.*

multocida de origem aviária através do agrupamento de 100% das cepas em sete padrões distintos. A técnica de PCR-RFLP é executável conforme as condições e os equipamentos existentes no nosso laboratório e se torna uma ferramenta disponível para a investigação epidemiológica de surtos de CA.

9. As cepas do grupo molecular II do PCR-RFLP apresentaram índices de patogenicidade superiores em relação aos grupos I, V, VI. Não foi observada uma associação dos grupos gerados no PCR-RFLP com os sorogrupos ou tipos capsulares. Embora alguns grupos do PCR-RFLP indiquem a existência de cepas mais virulentas, os resultados de tipificação necessitam ser interpretados em conjunto com o contexto clínico e epidemiológico em análises futuras.

10. O gene *pfhA*, seguido de *ompA*, foram importantes indicadores dos níveis de patogenicidade em aves. O *screening* de detecção dos 22 genes de virulência e de inferência através dos modelos de árvores de decisão, comparando-se os índices de patogenicidade anteriormente formulados, permite a identificação das cepas mais patogênicas de *P. multocida* sem a necessidade da inoculação em animais.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, T.A. *et al.* Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. **Vaccine**, v. 32, n. 8, p. 909-917, Feb. 2014.
- AL-HASANI, K. *et al.* Identification of novel immunogens in *Pasteurella multocida*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 3, p. 1-5, Jan. 2007.
- ANDREATTI FILHO, R.L. Cólera Aviária. *In:* _____. **Saúde Aviária e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 118-121.
- ANTONY, P. X. *et al.* Nucleic acid based differentiation of *Pasteurella multocida* serotypes. **The Internet Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, p. 85-89, 2007.
- ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. *In:* MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 6. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p. 190-208.
- ARUMUGAM, N.D. *et al.* Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts – a comparison of phenotypic and genotypic methods. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 1, p. 55-63, 2011.
- ATASHPAZ, S.; SHAYEGH, J.; HEJAZI, M.S. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 3, p. 355-357, Dec. 2009.
- 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.
- BABETSA, M. *et al.* Tetracycline resistance genes in *Pasteurella multocida* isolates from bovine, ovine, caprine and swine pneumonic lungs originated from different Greek prefectures. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 17, p. 3917-3923, May 2012.
- BACK, A. Cólera Aviária. *In:* BACK, A. (Ed.). **Manual de Doenças de Aves**. 2. ed. Cascavel: Integração, 2010. p. 127-131.
- BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Evolutionary biology of drug resistance. *In:* MAYERS, D.L. (Ed.) **Antimicrobial Drug Resistance**. New York: Human Press, 2009. cap. 2, p. 9-32.
- BARTH, A.L.; NUNES, L.S.; BAETHGEN, L.F. Tipagem molecular de microrganismos. *In:* SOARES, J.L.M.F.; ROSA, D.D.; LEITE, V.R.S.; PASQUALOTTO, A.C. (Ed.). **Métodos Diagnósticos: Consulta Rápida**. 2. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012. p. 662-666.

BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BECEIRO, A. *et al.* Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, Apr. 2013.

BELKUM, A.V. *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, suppl. 3, p. 1-46, Oct. 2007.

BERCHE, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, suppl. 5, p. 1-6, Oct. 2012.

BETHE, A. *et al.* Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 97-105, Oct. 2009.

BIBERSTEIN, E. L. *et al.* Distribution of indole-producing urease-negative pasteurellas in animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 4, p. 319-323, Oct. 1991.

BISGAARD, M. Salpingitis in web-footed birds: prevalence, aetiology and significance. **Avian Pathology**, v. 24, n. 3, p. 443-452, Sept. 1995.

BLACKALL, P.J. *et al.* Population structure and diversity of avian isolate of *Pasteurella multocida* from Australia. **Microbiology**, v. 144, p. 279-289, Feb. 1998.

BLACKALL, P.J.; MIFLIN, J.K. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. **Avian Pathology**, v. 29, p. 271-287, Aug. 2000.

BLACKALL, P.J.; PAHOFF, J.L.; BOWLES, P.R. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 355-360, Oct. 1997.

BLANCHONG, J.A. *et al.* Wetland environmental conditions associated with the risk of avian cholera outbreaks and the abundance of *Pasteurella multocida*. **Journal of Wildlife Management**, v. 70, p. 54-60, Jan. 2006.

BLUME, V. *et al.* Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. **International Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 161-166, Sept. 2009.

BOERLIN, P. *et al.* Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1235-1237, Mar. 2000.

BOJESSEN, A. *et al.* *Pasteurella multocida* infection in heterophil-depleted chicken. **Avian Diseases**, v. 48, p. 463-470, Sept. 2004.

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

BOROWSKI, S.M. *et al.* Padrão de resistência antimicrobiana de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em pulmões de suínos. **Revista FZVA**, v. 9, n. 1, p. 104-110, 2002a.

BOROWSKI, S.M. *et al.* Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 97-103, July/Sept. 2002b.

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

BORRATHYBAY, E. *et al.* Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 215-227, Dec. 2003.

BOSCH, M. *et al.* Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the fur protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, n. 1, p. 35-40, Sept. 2001.

BOSCH, M. *et al.* *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, n. 2, p. 201-208, May 2002.

BOWLES, R.E. Ribotype diversity of porcine *Pasteurella multocida* from Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 9, p. 630-5, Sept. 2000.

BOYCE, J.D. *et al.* Genome scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. **Infectious Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6871-6879, Dec. 2002.

BOYCE, J.D. *et al.* Genome scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within liver tissue of chickens with fowl cholera. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 3, p. 290-298, Mar. 2004.

BOYCE, J.D. *et al.* Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. **Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 870-880, Feb. 2006.

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

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

BOYCE, J.D.; ADLER, B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3463-3468, June 2000.

BOYCE, J.D.; ADLER, B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 117-122, Jan. 2006.

BOYCE, J.D.; CHUNG, J.Y.; ADLER, B. Genetic organization of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 121-134, Mar. 2000a.

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

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Lei nº 11794, de 08 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial [da] União**, Brasília DF, 09 out. 2008. Seção 1, p. 1.

BRUISTEN, S. M.; SCHOOLS, L. Molecular typing and clustering analysis as a tool for epidemiology of infectious diseases. *In*: KRÄMER, A.; KRETZSCHMAR, M.; KRICKEBERG, K. (Ed.) **Modern Infectious Disease Epidemiology**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 2010. p. 117-141.

BYWATER, R.; SILLEY, P.; SIMJEE, S. Antimicrobial breakpoints - definitions and conflicting requirements. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1-2, p. 158-159, Nov. 2006.

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

CARTER, G.R. A new serological type of *Pasteurella multocida* from Central Africa. **Veterinary Record**, v. 3, n. 42, p. 1052, 1961.

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. Rapid presumptive identification of type BP. *multocida* from hemorrhagic septicaemia. **Veterinary Record**, v. 128, n. 22, p. 526, June 1991.

CARTER, G.R.; RUNDELL, S.W. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **Veterinary Record**, v. 96, n. 15, p. 343, Apr. 1975.

CARTER, G.R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* using acriflavine. **American Journal Veterinary Research**, v. 34, p. 293-295, Feb. 1973.

CASTILLO, G. *et al.* Aislamiento e Identificación Bioquímica de Cepas de *Pasteurella multocida* y *Gallibacterium anatis* en Aves de Producción con Signos Respiratorios. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 25, n. 4, p. 516-522.

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

CHEAH, A.E.; CHONG, A.K. Bites to the hand: are they more than we can chew? **Singapore Medicine Journal**, v. 52, n. 10, p. 715-718, Oct. 2011.

CHEN, H.I.; HULTEN, K.; CLARRIDGE, J.E. Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3438-3441, Sept. 2002.

CHOMNAWANG, M.T. *et al.* Expression and immunoprotective property of a 39-kDa PlpB protein of *Pasteurella multocida*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 11, p. 1479-1485, Nov. 2009.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-60, June 2001.

CHRISTENSEN H. *et al.* Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 259-270, Jan. 2005.

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

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

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

CHRISTENSEN, J.P.; DIETZ, H.H.; BISGAARD, M. Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from back-yard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna Denmark. **Avian Pathology**, v. 27, n. 4, p. 373-381, 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, Apr. 2001.

CHUNG, J.Y.; ZHANG, Y.; ADLER, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, n. 2, p. 289-296, Sept. 1998.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. CLSI document M45-A2**, Wayne, v. 30, n. 18, 2010. 77 p.

CLSI. Clinical and Laboratorial Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility tests; Twenty second informational supplement. CLSI M100-S22**, Wayne, v. 32, n. 3, 2012. 184 p.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. CLSI document VET 01-A4**, Wayne, v. 33, n. 7, 2013a. 80 p.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2**, v.33, n.8, 2013b. 70p.

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

COX, A.J. *et al.* Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, n. 6, p. 287-296, June 2003.

CRESS, B.F. *et al.* Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 660-697, July 2014.

DA ROCHA, D.T. **Utilização de redes neurais artificiais para a classificação da resistência a antimicrobianos e sua relação com a presença de 38 genes associados a virulência isolados de amostras de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DABO, S.M. *et al.* Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extra-cellular matrix molecules. **Microbiology Pathogenesis**, v. 35, n. 4, p. 147-157, Oct. 2003.

DABO S.M. *et al.* Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. **Vaccine**, v. 26, n. 34, p. 4345-51, Aug. 2008.

DAVIES, R.L. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. **Microbiology**, v. 150, p. 4199-4210, Dec. 2004.

DAVIES, R.L. *et al.* Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 59-67, Jan. 2003a.

DAVIES R.L.; MACCORQUODALE, R.; CAFFREY, B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p. 169-182, Feb. 2003b.

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, n. 2, p. 145-158, Jan. 2004.

DAYAO, D.A. *et al.* Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 1-2, p. 232-235, June 2014.

DeANGELIS, P. L. *et al.* Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 14, p. 8454-8458, Apr. 1998.

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

DONNIO, P.Y. *et al.* Dermonecrotic toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from man. **Journal of Medical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 333-337, June 1991.

DONNIO, P.Y.; LERESTIF-GAUTIER, A.L.; AVRIL, J.L. Characterization of *Pasteurella* spp. strains isolated from human infections. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 2-3, p. 137-142, Feb./Apr. 2004.

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

DZIVA, F. *et al.* Random amplification of polymorphic DNA and phenotypic typing of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 361-372, Oct. 2001.

DZIVA, F. *et al.* Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1-2, p. 117-122, Aug. 2004.

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

EIGAARD, N.M. *et al.* Clonal stability of *Pasteurella multocida* in free-range layers affected by fowl cholera. **Avian Pathology**, v. 35, n. 2, p. 165-172, Apr. 2006.

- EL TAYEB, A.B.; MORISHITA, T.Y.; ANGRICK, E.J. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 2, p. 121-125, Mar. 2004.
- ESPINOSA, I.E.; M. BAEZ, J.; VICHI, S. M. Antimicrobial Resistance and genes associated to the host-microbe interaction of *Pasteurella multocida* isolates from swine in Western Cuba. **Revista Salud Animal**, v. 34, n. 3, p. 151-158, Sept./Dec. 2012.
- EWERS, C. *et al.* Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3-4, p. 304-317, May 2006.
- FEGAN, N.; BLACKALL, P.J.; PAHOFF, J.L. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 47, n. 3-4, p. 281-286, Dec. 1995.
- FERREIRA, T.S.P. *et al.* Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in Brazil. **The Scientific World Journal**, July 2012. Disponível em: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417173/>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417173/). Acesso em 15 de março de 2013.
- FILHO, J.I.S.; TALAMINI, D.J.D. Panorama e perspectivas para a cadeia produtiva de frangos. **Avicultura Industrial**, v. 106, n. 11, p.22-29, 2014.
- FILHO, J.I.S. Cluster of economic development due to production and slaughtering chickens and pigs in Brazil. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 51, 2014, Barra dos Coqueiros. **Resumos**. Barra dos Coqueiros: A produção animal frente às mudanças climáticas e tecnológicas. Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2014. CD-ROM.
- FRESHWATER, A. Why your housecat's trite little bite could cause you quite a fright: a study of domestic felines on the occurrence and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida*. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 8-10, p. 507-13, Oct. 2008.
- FURIAN, T.Q. **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- GANDRA, E.A. *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GARCIA, N. *et al.* Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain. **Veterinary Record**, v. 169, n. 14, p. 362, Oct. 2011.

GERARDO, H. S. *et al.* *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and alpha-glucosidase activity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2558-2564, July 2001.

GHANIZADEH, A. *et al.* Genotyping of *Pasteurella multocida* ovine and bovine isolates from Iran based on PCR-RFLP of *ompH* gene. **Archives of Razi Institute**, v. 70, n. 3, p. 151-156, 2015.

GIORDANO, A. Clinical Features and Outcomes of *Pasteurella multocida* Infection. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 36, p. 1-7, Sept. 2015.

GÓRNIAK, S.L.; SPINOSA, H.S. Antimicrobianos na avicultura – uso e restrições. *In*: ANDREATTI FILHO, R.L. (Ed.). **Saúde Aviária e Doenças**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 118-121.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, n. 4, p. 857-874, Dec. 1971.

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.

GLISSON, J.R.; SANDHU, T.S.; HOFACRE, C.L. 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, 2008. p. 12-18.

GUENTHER, S. *et al.* Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 1, p. 75-80, Sept. 2008.

GUILBART, M. *et al.*, Fatal multifocal *Pasteurella multocida* infection: a case report. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 287, p. 1-4, July 2015.

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

GUNAWARDANA, G.A.; TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J. Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 97-109, Mar. 2000.

HABRUN, B. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from diagnostic samples from large pig breeding farms in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 5, p. 571-583, 2010.

HAO, H. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 288, p. 1-11, June 2014.

- HARPER, M. *et al.* Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 477-85, Feb. 2015.
- HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 1, p. 1-10, Dec. 2006.
- HARPER, M.; 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, n. 1-2; p. 1-17, July 2010.
- HEDDLESTON, K.L.; GALLAGHER, J.E.; REBERS, P.A. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. **Avian Diseases**, v. 16, n. 4, p. 925-936, July/Sept. 1972.
- HEDDLESTON, K.L.; WATKO, L.P.; REBERS, P.A. Dissociation of fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. **Avian Diseases**, v. 8, n. 4, p. 649-657, Nov. 1964.
- HIRSH, D.C. *et al.* Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from waterfowl and associated avian species in California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 2, 204-209, Apr. 1990.
- HOLST, E. *et al.* Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 2984-2987, Nov. 1992.
- HORIGUCHI, Y. Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella* dermonecrotic toxin. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 361, p. 113-129, 2012.
- HUANG, Y. Advances in Artificial Neural Networks - Methodological Development and Application. **Algorithms**, v. 2, p. 973-1007.
- HUANG, T.M.; LIN, T.L.; WU, C.C. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, and *Pasteurella multocida* isolates. **Avian Diseases**, v. 53, n. 1, p.89-93, Mar. 2009.
- HUNT, M.L.; ADLERA, B.; TOWNSEND, K.M. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 3-25, Mar. 2000.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, Nov. 1988.
- JABBARI, A.R.; ESMAELIZADEH, M. Molecular typing of avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR-RFLP of *ompH* gene. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 99-103, Apr. 2005.

JABBARI, A.R.; ESMAELZADEH, M.; MOAZENI JULA, G.R. Polymerase chain reaction of *Pasteurella multocida* capsules isolated in Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 7, n. 3, p. 50-55, 2006.

JACQUES, M. *et al.* Virulence capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4785-4792, Nov. 1993.

JACQUES, M. *et al.* Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron restricted conditions and *in vivo*. **Microbiology**, v. 140, p. 263-270, Feb. 1994.

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

JAGLIC, Z. *et al.* Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits in the Czech Republic. **Veterinární Medicína**, v. 51, n. 5, p.278-287, 2006.

JAMALUDIN, R. *et al.* Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, n. 3, p. 203-207, 2005.

JEONG, H.Y. *et al.* Molecular epidemiology of community-associated antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* in Seoul, Korea (2003): pervasiveness of multidrug-resistant SCCmec type II methicillin-resistant *S. aureus*. **Microbial Drug Resistance**, v. 13, n. 3, p. 178-185, 2007.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. 6. ed. New York: Pearson, 2007. 800 p.

JOHNSON, T.J. *et al.* Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 106, p.1-10, May 2013.

JONES, K.H. *et al.* A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. **Poultry Science**, v. 92, n. 12, p. 3166-3171, Dec. 2013.

JORGENSEN, J.; FERRARO, M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p.1749-1755, Dec. 2009.

KALHORO, D.H. *et al.* *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida*. **Pakistan Journal of Agriculture: Agricultural Engineering Veterinary Sciences**, v. 26, n. 2, p. 80-86, 2010.

KALLEN, A.J. *et al.* Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network,

2006-2008. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 5, p. 528-531, May 2010.

KANE, T.A.; WHITE, C.L.; DEANGELIS, P.L. Functional Characterization of PmHS1, a *Pasteurella multocida* Heparosan Synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33192-33197, Nov. 2006.

KARDOS, G.; KISS, I. Molecular epidemiology investigation of outbreaks of fowl cholera in geographically related poultry flock. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2959-2961, June 2005.

KASPAR, H.; SCHRÖER, U.; WALLMANN, J. Quantitative resistance level (MIC) of *Pasteurella multocida* isolated from pigs between 2004 and 2006: national resistance monitoring by the BVL. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 120, n. 9-10, p. 442-51, Sept./Oct. 2007.

KASTEN, R.W. *et al.* Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 676-682, July/Sept. 1997.

KATOCH, S. *et al.* *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 3, p. 183-91, Sept. 2014.

KATOCH *et al.* Experimental Study of the Pathogenicity of *Pasteurella multocida* Capsular Type B in Rabbits. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, n. 2-3, p.160-166, Aug./Oct. 2015

KATSUDA, K. *et al.* Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 737-741, Dec. 2013.

KAWASHIMA, S. *et al.* *Pasteurella multocida* meningitis caused by kissing animals: a case report and review of the literature. **Journal of Neurology**, v. 257, p. 653-654, Apr. 2010.

KEHRENBERG, C. *et al.* Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 323-339, May/Aug. 2001.

KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S. Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 773-775, May 2005.

KEHRENBERG, C.; THAM, N.T.; SCHWARZ, S. New plasmid-borne antibiotic resistance gene cluster in *Pasteurella multocida*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2978-2980, Sept. 2003.

KELLY, L. *et al.* Animal growth promoters: to ban or not to ban? A risk assessment approach. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 3, p. 205-212, Sept. 2004.

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

KHAN, M.Z.I. Serotyping of *Pasteurella multocida* based on capsules in ducks in Kelantan, Malaysia. **Asian Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 11, p. 713-715, Nov. 2014.

KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 9, p. 1781-1804, Sept. 2008.

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

KUHNERT, P., KORCZAK, B.M. Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G + C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). **Microbiology**, v. 152, p. 2537-2548, Sept. 2006.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar. 1977.

LANDONI; M.F.; ARBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 205, n. 1-2, July 2014.

LANGFELDER P.; ZHANG, B.; HORVATH, S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the dynamic tree cut package for R. **Bioinformatics**, v. 24, n. 5, p. 719-720, Mar. 2008.

LEE, J.; KIM, Y.B.; KWON, M. Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 179-184, Apr. 2007.

LEHR, M.A. *et al.* Associations between water quality, *Pasteurella multocida*, and avian cholera at Sacramento National Wildlife Refuge. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 2, p. 291-297, Apr. 2005.

LEOTTA, G.A. *et al.* Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, p.125-129, jul/set. 2006a.

LEOTTA, G.A. *et al.* Evaluación de dos técnicas de subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 38, n. 4, p. 190-196, Oct/Dec. 2006b.

- LIVRELLI, V.O.; PEDUZZI J.; JOLY, B. Sequence and molecular characterization of the ROB1- β -lactamase gene from *Pasteurella haemolytica*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 35, n. 2, p. 242-251, Feb. 1991.
- LOCHT, C.; ANTOINE, R.; JACOB-DUBUISSON, F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 82-9, Feb. 2001.
- LUO, Y. *et al.* Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chicken against homologous strain challenge. **Vaccine**, v. 17, n. 7-8, p. 821-831, Feb. 1999.
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams; Wilkins, 2000. 912 p.
- MADIGAN, M.T. *et al.* Princípios de Genética Bacteriana. In: _____. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 278-309.
- MAGIORAKOS, A.P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, Mar. 2011.
- MATHEW, A.G.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 115-133, 2007.
- MATSUMOTO, M., STRAIN, J.G. Pathogenicity of *Pasteurella multocida*: its variable nature demonstrated by *in vivo* passages. **Avian Diseases**, v. 37, p. 781-785, Jul/Sept. 1993.
- MAY, B.J. *et al.* Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 6, p. 3460-3465, Mar. 2001.
- MELNIKOW, E. *et al.* A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 3-4, p.277-292, Oct. 2008.
- MIGURA, L.G. *et al.* Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p.1-9, May 2014.
- 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, p. 6874-6883, Dec. 2000.
- MOHAMED, M.A. *et al.* *Pasteurella multocida* in backyard chickens in Upper Egypt: incidence with polymerase chain reaction analysis for capsule type, virulence in chicken

embryos and antimicrobial resistance. **Veterinaria Italiana**, v. 48, n. 1, p. 77-86, Jan/Mar. 2012.

MORAES *et al.* Ocorrência de genes tad associados à formação de biofilme em isolados de *Pasteurella multocida* de pulmões de suínos com pneumonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, Dec. 214.

MUHAIRWA, A.P. *et al.* Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 2, p.139-153, Jan. 2001.

MUHAIRWA, A.P.; CHRISTENSEN, J.P.; BISGAARD, M. Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. **Avian Pathology**, v. 29, n. 2, p. 133-142, Apr. 2000.

MUTTERS, R. *et al.* Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, n. 3, p. 309-322, 1985.

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.

NAUSHAD, S. *et al.* Phylogenomic and Molecular Demarcation of the Core Members of the Polyphyletic *Pasteurellaceae* Genera *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*. **International Journal of Genomics**, v. 2015, p. 1-15, Mar. 2015.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, Dec. 2003.

OEHLER, R.L. *et al.* Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. **The Lancet Infectious Disease**, v. 9, n. 7, p. 439-447, July 2009.

OIE, Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: **OIE Terrestrial Manual**. 2012. p. 1311-1321.

OKAY, S., KIZILDOĞAN, A.K. Comparative genome analysis of five *Pasteurella multocida* strains to decipher the diversification in pathogenicity and host specialization. **Gene**, v. 567, n. 1, p. 58-72, Aug. 2015.

OLIVEIRA, S.J. **Guia Bacteriológico Prático - Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Canoas: ULBRA, 2012. 260 p.

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

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de Biologia Molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (Ed.). **Biologia Molecular Básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. p. 379-413.

PATZ, J.A. *et al.* Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1092-2000, July 2004.

PAUSTIAN, M.L. *et al.* Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6714-6720, Dec. 2002.

PEDERSEN, K. *et al.* *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. **Journal of Wildlife Disease**, v. 39, n. 4, p. 808-816, Oct. 2003.

PER, H. *et al.* Meningitis and subgaleal, subdural, epidural empyema due to *Pasteurella multocida*. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 39, n. 1, p. 35-38, July 2010.

PETERSEN, A. *et al.* MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia and development of a real-time PCR specific for haemorrhagic septicaemia associated isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 3-4, p. 335-341, June 2014.

PETERSEN, K.D. *et al.* Virulence of *Pasteurella multocida subsp. multocida* isolated from outbreaks of fowl cholera in wild birds for domestic poultry and game birds. **Avian Pathology**, v. 30, n. 1, p.27-31, Feb. 2001.

PETERSEN, K.D.; CHRISTENSEN, J.P.; BISGAARD, M. Phenotypic and genotypic diversity of organisms previously classified as maltose positive *Pasteurella multocida*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 288, n. 1, p. 1-12, July 1998.

PIDDOCK, L.J.V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 4, p. 307-318, Mar. 1990.

PILATTI, R.M. **Determinação de parâmetros para o estabelecimento de um índice de patogenicidade de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves e suínos, através da inoculação de pintinhos de um dia de idade**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PRUIMBOOM, I.M. *et al.* Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. **Avian Diseases**, v. 40, n. 4, p. 887-893, Oct./Dec. 1996.

PRUIMBOOM, I.M.; RIMLER, R.B.; ACKERMANN, M.R. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1292-1296, Mar. 1999.

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

PYORALA, S. *et al.* Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 230-239, May 2014.

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

RATLEDGE; C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 881-941, 2000.

REGGIE, Y.C.L. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 23-35, Oct. 2001.

RHOADES, K.R.; RIMLER, R.B. *Pasteurella multocida* colonization and invasion in experimentally exposed turkey poults. **Avian Diseases**, v. 34, n. 2, p. 381-383, Apr/June 1990.

RHOADES, K.R.; RIMLER, R.B.; BAGLEY, R.A. Fowl cholera epornitic: antigenic characterization and virulence of selected *Pasteurella multocida* isolates. **Avian Diseases**, v. 36, n. 1, p. 84-87, Jan.-Mar. 1992.

RIGOBELLO, E.C. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* isolated from chickens and Japanese quails in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 161-164, Mar. 2013.

ROCHA, A.C.G.P. **Utilização de Inteligência Artificial para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Frangos de Corte**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

RODLOFF, A. *et al.* Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 105, n. 39, p. 657-662, Sept. 2008.

RUBIN, J. Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. *In*: GIGUERE, S.; PRESCOTT, J.F.; DOWLING, P.M. (Ed.). **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 5. ed. Ames: Wiley Blackwell, 2013. p. 11-20.

SALLE, C.T.P. *et al.* **Use of Artificial Intelligence (Artificial Neural Networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers**. *In*: 60th Western Poultry Disease Conference, 2011, **Abstracts**. Sacramento: Proceedings 60th Western Poultry Disease Conference, 2011. p. 13-15.

SAMUEL, M.D. *et al.* Avian cholera in waterfowl: the role of lesser snow and Ross's geese as disease carriers in the playa lakes region. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 1, p. 48-57, Jan. 2005.

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.

SAN MILLAN, A. *et al.* Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3399-3404, Aug. 2009.

SAWADA, T.; RIMIER, R.B.; RHOADES, K.R. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 752-756, May 1982.

SCHWARZ, S. *et al.* Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-604, Feb. 2010.

SELLYEI, B. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 57, n. 3, p. 357-367, Sept. 2009.

SELLYEI, B.; IVANICS, E.; MAGYAR, T. Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the *omph* gene. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, n. 1, p.1-8, Mar. 2013.

SELLYEI, B.; WEHMANN, E.; MAGYAR, T. Sequencing-independent method for the differentiation of the main phylogenetic lineages of *Pasteurella multocida*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 4, p. 735-738, July 2012.

SERRA, D.O. *et al.* FHA-Mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. **PLoS One**, v. 6, n. 12, 2011.

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.* Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 36, n. 8, p. 743-750, Nov. 2004.

SHIVACHANDRA, S.B. *et al.* Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 3, p. 561-564, Nov. 2006.

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.

SHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A.A.; CHAUDHURI, P. Molecular characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup-A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR. **Comparative Immunology, Microbiology; Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 47-62, Jan. 2008.

SIMJEE, S. *et al.* Potential confusion regarding the term 'resistance' in epidemiological surveys. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 228-229, Jan. 2008.

SINGH, R. *et al.* Molecular characterization and computational analysis of the major outer membrane protein (*ompH*) gene of *Pasteurella multocida* P52. **Veterinary Archives**, v. 81, n. 2, p. 211-222, Apr. 2011.

SINGH, R. *et al.* Studies on the presence and persistence of *Pasteurella multocida* serovars and genotypes in fowl cholera outbreaks. **Avian Pathology**, v. 42, n. 6, p. 581-585, Dec. 2013.

SINGH, R. *et al.* Epidemiology of fowl cholera in free range broilers. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 124-128, Mar. 2014.

SMITH, S.G. *et al.* A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 273, n. 1, p. 1-11, Aug. 2007.

SNIPES, K.P. *et al.* Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-89. **Avian Diseases**, v. 34, n. 2, p. 315-320, Apr./June 1990.

SOARES, T.C.S. *et al.* Perfil de sensibilidade de amostras de *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica* isoladas na região de Botucatu, São Paulo, Brasil, no período de janeiro de 2000 a novembro de 2007. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 173-179, 2009.

STAHEL, A.B.J. *et al.* Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 6, p. 793-802, Nov. 2009.

STEEN, J.A. *et al.* Fis is essential for capsule production in *Pasteurella multocida* and regulates expression of other important virulence factors. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. 1-14, Feb. 2010.

STEPNIEWSKA, K.; MARKOWSKA-DANIEL, I. Phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Poland. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 57, n. 1, p. 29-34, Mar. 2013.

TABATABAI, L.B.; ZEHR, E.S. Identification of five outer membrane associated proteins among cross-protective factor proteins of *Pasteurella multocida*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1195-1198, Feb. 2004.

TALAN, D.A. *et al.* Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 85-92, Jan. 1999.

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.

TATUM, F.M.; TABATABAI, L.B.; BRIGGS, R.E. Protection against fowl cholera conferred by vaccination with recombinant *Pasteurella multocida* filamentous hemagglutinin peptides. **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 169-74, June 2009.

TATUM, F.M.; YERSIN, A.G.; BRIGGS, R.E. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida fhaB2* mutant in turkeys. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 1-2, p. 9-17, July/Aug. 2005.

TOMICH, M.; PLANET, P.J.; FIGURSKI, D.H. The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 363-375, May 2007.

TOSET, F.C. *et al.* Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 690-694, Dec. 2013.

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

TOWNSEND, K.M. *et al.* Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 924-929, Mar. 2001.

TSAI, Y.C. *et al.* Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of the genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 543-546, May 2011.

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

UBABEF - UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. História da avicultura no Brasil. Disponível em <www.ubabef.com.br>. Acesso em: 03 de janeiro de 2014.

USDA - United States Department of Agriculture. Livestock and poultry: world markets and trade. Disponível em <www.usda.gov>. Acesso em 28 de dezembro de 2014.

VARGA, Z. *et al.* Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 1-2, p.149-156, Apr. 2013.

VARGA, Z.; SELLYEI, B.; MAGYAR, T. Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 55, n. 4, p. 425-434, Dec. 2007.

VASFI MARANDI, M.; HAREL, J.; MITTAL, K.R. Identification by monoclonal antibodies of serotype D strains of *Pasteurella multocida* representing various geographic origins and host species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 603-610, July 1997.

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

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.

WALSH, C.; FANNING, S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens - a cause for concern? **Current Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 808-815, Sept. 2008.

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 1, p.1-7, July 2001.

WASSENAAR, T.M.; SILLEY, P. Antimicrobial resistance in zoonotic bacteria: lessons learned from host-specific pathogens. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-186, Dec. 2008.

WATT, J.M. *et al.* Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, n. 1, p. 9-14, Aug. 2003.

WEISER, G.C. *et al.* Characterization of *Pasteurella multocida* associated with pneumonia in bighorn sheep. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, p. 536-544, July 2003.

WEISS, H.B.; FRIEDMAN, D.I.; COBEN, J.H. Incidence of dog bite injuries treated in emergency departments. **The Journal of the American Medical Association**, v. 279, n. 7, p.51-53, Jan. 1998.

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. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 631-655, July 2013.

WOLFE, N.D.; DUNAVAN, C.P.; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**, v. 447, p. 279-283, May 2007.

WOO, Y.K.; KIM, J.H. Fowl cholera outbreak in domestic poultry and epidemiological properties of *Pasteurella multocida* isolate. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 344-353, June 2006.

WRIGHT, C.L.; STRUGNELL, R.A.; HODGSON, A.L. Characterization of a *Pasteurella multocida* plasmid and its use to express recombinant proteins in *P. multocida*. **Plasmid**, v. 37, n. 1, p.65-79, 1997.

WU, J.R. *et al.* Protective immunity conferred by recombinant *Pasteurella multocida* lipoprotein E (PlpE). **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4140-4148, May 2007.

YAMAMOTO, J.; SAKANO, T.; SHIMIZU, M. Drug resistance and R plasmids in *Pasteurella multocida* from swine. **Microbiology Immunology**, v. 34, n. 9, p. 715-721, 1990.

YOSHIMURA, H. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Disease and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 7, p. 555-560, Sept. 2001.

ZAGLIC, Z. *et al.* Characterisation 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.

ZHANG, P. *et al.* Molecular epidemiology of two fowl cholera outbreaks on a free-range chicken layer farm. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 458-460, Sept. 2004.

APÊNDICE A – Origem, condições do hospedeiro e ano de isolamento das 96 cepas de *Pasteurella multocida* selecionados para o estudo.

(continua)

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

APÊNDICE A – Origem, condições do hospedeiro e ano de isolamento das 96 cepas de *Pasteurella multocida* selecionados para o estudo.

(continuação)

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

APÊNDICE A – Origem, condições do hospedeiro e ano de isolamento das 96 cepas de *Pasteurella multocida* selecionados para o estudo.

(continuação)

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

APÊNDICE A – Origem, condições do hospedeiro e ano de isolamento das 96 cepas de *Pasteurella multocida* selecionados para o estudo.

(conclusão)

Número	Origem	Condição do hospedeiro	Ano de isolamento
92	Suíno	Frigorífico	ND
93	Suíno	Frigorífico	ND
94	Suíno	Frigorífico	ND
95	Suíno	Frigorífico	1995
96	Suíno	Frigorífico	1995

APÊNDICE B - Padrões dos testes bioquímicos dos controles positivos e padrões de classificação das subespécies e dos biovars de *Pasteurella multocida*.

Tabela 1 - Cepas padrão selecionadas como controles positivos dos testes bioquímicos executados para classificação da subespécie e do biovar de *Pasteurella multocida*.

Cepa	Teste bioquímico
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Lactose
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Sorbitol
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Xilose
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Maltose
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Ornitina
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Dulcitol
<i>Avibacterium gallinarum</i> ATCC 13360	Trealose

Tabela 2 - Classificação das subespécies de *Pasteurella multocida* a partir da fermentação dos carboidratos sorbitol, dulcitol e trealose (Mutters *et al.*, 1985).

Subespécies	Sorbitol	Dulcitol	Trealose
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	+	-	+
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	-	-	+
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	+	+	-

+ mais de 90% das amostras positivas.

- mais de 90% das amostras negativas.

Tabela 3 - Características bioquímicas dos biovars de *Pasteurella multocida* (FEGAN; BLACKALL; PAHOFF, 1995; BLACKALL; PAHOFF; BOWLES, 1997).

Fermentação	Biovar													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	
Xilose	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
Trealose	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	

+ mais de 90% das amostras positivas.

- mais de 90% das amostras negativas.

APÊNDICE C - Genes de virulência selecionados, processo ou função enzimática relacionada, sequência e referência dos primers, tamanho dos amplicons.

Gene	Processo ou enzima	Sequência dos primers (5' - 3')	Referência dos primers	Amplicon (pb)
<i>ompH</i>	proteína de membrana externa	CGCGTATGAAGTTTAGGT TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	Ewers <i>et al.</i> (2006)	438
<i>oma87</i>	proteína de membrana externa	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	Ewers <i>et al.</i> (2006)	948
<i>ompA</i>	proteína de membrana externa	CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC CATAAACAGATTGACCGAAACG	Tang <i>et al.</i> (2009)	201
<i>psl</i>	proteína de membrana externa	TCTGGATCCATGAAAAACTAACTAAAGTA AAGGATCCTTAGTATGCTAACACAGGACGACG	Kasten <i>et al.</i> (1997)	480
<i>plpB</i>	lipoproteína	TTTGGTGGTGCATGTCTTCT AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	Tang <i>et al.</i> (2009)	282
<i>sodA</i>	superóxido dismutase	TACCAGAATTAGGCTACGC GAAACGGGTGCTGCCGCT	Ewers <i>et al.</i> (2006)	361
<i>sodC</i>	superóxido dismutase	AGTTAGTAGCGGGTTGGCA TGGTGTGGGTGATCATCATG	Lainson <i>et al.</i> (1996)	235
<i>hgbA</i>	captação de ferro	TGGCGGATAGTCATAAG CCAAAGAACCACTACCCA	Ewers <i>et al.</i> (2006)	419
<i>hgbB</i>	captação de ferro	ACCGCGTTGGAATTATGATTG CATTGAGTACGGCTTGACAT	Ewers <i>et al.</i> (2006)	788
<i>fur</i>	regulação captação do ferro	GTTTACCGTGTATTAGACCA CATTACTACATTTGCCATAC	Tang <i>et al.</i> (2009)	244
<i>exBD-tonB</i>	metabolismo do ferro	GGTGGTGATATTGATGCGGC GCATCATGCGTGCACGGTT	Ewers <i>et al.</i> (2006)	1144
<i>nanB</i>	sialidase	GTCCTATAAAGTGACGCCGA ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	Ewers <i>et al.</i> (2006)	554
<i>nanH</i>	sialidase	GAATATTTGGGCGGAACA TTCTCGCCCTGTCACTACT	Ewers <i>et al.</i> (2006)	360
<i>ptfA</i>	fímbria do tipo IV	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC TCATGAATTCTTATGCGCAAATCCTGCTGG	Doughty; Ruffolo; Adler, (2000)	488
<i>pfhA</i>	hemaglutinia	AGCTGATCAAGTGGTGAAC TGGTACATTGGTGAATGCTG	Ewers <i>et al.</i> (2006)	275
<i>hsf-1</i>	adesina	TTGAGTCGGCTGTAGAGTTTCG ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC	Tang <i>et al.</i> (2009)	654
<i>tadD</i>	adesina	TCTACCCATTCTCAGCAAGGC ATCATTTCGGGCATTACCC	Tang <i>et al.</i> (2009)	416
<i>toxA</i>	toxina dermonecrótica	CCTAGATGAGCGACAAGGTT GGAATGCCACACCTCTATA	Ewers <i>et al.</i> (2006)	865
<i>pmHAS</i>	Sintetase do ácido hialurônico	TCAATGTTTGCATAGTCCGTTAG TGGCGAATGATCGGTGATAGA	Tang <i>et al.</i> (2009)	430
<i>hyaD-hyaC</i>	biossíntese cápsula A	TGCCAAAAATCGCAGTCCAG TTGCCATCATTGTCCAGTG	Townsend <i>et al.</i> (2001)	1044
<i>becD</i>	biossíntese cápsula B	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	Townsend <i>et al.</i> (2001)	760
<i>dcbF</i>	biossíntese cápsula D	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	Townsend <i>et al.</i> (2001)	657

APÊNDICE D - Índices de patogenicidade (IP) das 96 cepas de *Pasteurella multocida* obtidos através de estudo *in vivo* por Pilatti (2014), conforme o hospedeiro de origem.

Cepas de origem aviária (n=56)				Cepas de origem suína (n=40)			
Número	IP	Número	IP	Número	IP	Número	IP
1	2,99	29	8,92	57	1,17	85	1,58
2	7,9	30	8,87	58	4,89	86	1,67
3	4,43	31	6,43	59	1,75	87	3,89
4	2,29	32	5,46	60	5,24	88	7,2
5	7,8	33	4,88	61	6,65	89	5,26
6	3,31	34	3,27	62	6,42	90	7,25
7	7,44	35	5,63	63	1,25	91	2,42
8	7,57	36	4,69	64	8,27	92	3,6
9	8,26	37	5,17	65	3,5	93	2,25
10	9,13	38	9,33	66	8,75	94	6,11
11	6,58	39	8,6	67	5,44	95	1,33
12	8	40	8,44	68	6,31	96	1,33
13	9,67	41	7,36	69	4,73		
14	7,82	42	9,18	70	7,5		
15	7,92	43	8,93	71	2,6		
16	8,08	44	7,75	72	1,33		
17	7,42	45	7,69	73	3,79		
18	5,83	46	7,75	74	7,75		
19	8,51	47	8,13	75	3,12		
20	7,93	48	6,56	76	4,44		
21	7,92	49	8,5	77	5,81		
22	8,58	50	8,25	78	4,93		
23	6,93	51	8,69	79	6,77		
24	3,95	52	4,8	80	2,1		
25	5,07	53	2,17	81	2		
26	8,06	54	4,39	82	1,08		
27	8,25	55	1,33	83	1,42		
28	0,17	56	4,56	84	2,5		

APÊNDICE E - Perfil de resistência antimicrobiana e classificação de multirresistência das 96 cepas de *Pasteurella multocida* avaliadas.

(continua)

Cepa	Origem	Resistência antimicrobiana	Multirresistência
1	Ave	ENR*, TET, SOX	Sim
2	Ave	SOX	-
3	Ave	TET	-
4	Ave	TET, SOX	-
5	Ave	-	-
6	Ave	TET, SOX	-
7	Ave	SOX	-
8	Ave	SOX	-
9	Ave	SOX	-
10	Ave	SOX	-
11	Ave	SOX	-
12	Ave	-	-
13	Ave	ENR*, SOX	-
14	Ave	-	-
15	Ave	ENR*, SOX, SXT	Sim
16	Ave	SOX, SXT	-
17	Ave	-	-
18	Ave	SOX, SXT	-
19	Ave	SOX	-
20	Ave	SOX, SXT	-
21	Ave	SOX, SXT	-
22	Ave	-	-
23	Ave	SOX, SXT	-
24	Ave	TET, SOX, SXT	Sim
25	Ave	SOX, SXT	-
26	Ave	SOX	-
27	Ave	CIP*, ENR*	-
28	Ave	ENR*, ERY, TET, SOX	Sim
29	Ave	CIP*, ENR*, SOX	-
30	Ave	CIP*, ENR*, SOX	-
31	Ave	SOX	-
32	Ave	-	-
33	Ave	SOX, SXT	-
34	Ave	SOX	-
35	Ave	SOX	-
36	Ave	AMX, ERY*, SOX, SXT	Sim
37	Ave	-	-
38	Ave	CIP*	-
39	Ave	CIP, ENR, SOX	-
40	Ave	CIP, ENR, SOX	-
41	Ave	CIP, ENR, SOX	-
42	Ave	TIO, CIP, GEN, ENR, TET, SOX, SXT	Sim

APÊNDICE E - Perfil de resistência antimicrobiana e classificação de multirresistência das 96 cepas de *Pasteurella multocida* avaliadas.

(continuação)

Cepa	Origem	Resistência antimicrobiana	Multirresistência
43	Ave	CIP, ENR*, SOX	-
44	Ave	SOX	-
45	Ave	SOX	-
46	Ave	ERY*, SOX	-
47	Ave	SOX	-
48	Ave	SOX	-
49	Ave	SOX	-
50	Ave	-	-
51	Ave	SOX	-
52	Ave	SOX	-
53	Ave	SOX	-
54	Ave	ENR, SOX	-
55	Ave	-	-
56	Ave	SOX	-
57	Suíno	TET	-
58	Suíno	SOX	-
59	Suíno	-	-
60	Suíno	SOX	-
61	Suíno	SOX, SXT	-
62	Suíno	GEN, ERY*, SOX	Sim
63	Suíno	ENR*, ERY, TET, SOX	Sim
64	Suíno	ERY*	-
65	Suíno	ERY, SOX	-
66	Suíno	ENR*, ERY, TET, SOX, SXT	Sim
67	Suíno	SOX, SXT	-
68	Suíno	SOX	-
69	Suíno	TIO*, TET, SOX, SXT	Sim
70	Suíno	SOX	-
71	Suíno	SOX, SXT	-
72	Suíno	SOX	-
73	Suíno	TIO*, CIP*, ENR*, ERY, TET, SOX, SXT	Sim
74	Suíno	SOX, SXT	-
75	Suíno	-	-
76	Suíno	TIO*, ERY, TET, SOX	Sim
77	Suíno	SOX, SXT	-
78	Suíno	SOX, SXT	-
79	Suíno	TET, SOX, SXT	Sim
80	Suíno	SOX	-
81	Suíno	SOX	-
82	Suíno	SOX	-
83	Suíno	TIO, CIP*, ENR*, ERY, TET, SOX	Sim
84	Suíno	TIO*, CIP*, ENR*, ERY, TET, SOX	Sim
85	Suíno	ERY, TET, SOX	Sim
86	Suíno	TIO, CIP*, ENR*, ERY, TET, SOX, SXT	Sim

APÊNDICE E - Perfil de resistência antimicrobiana e classificação de multirresistência das 96 cepas de *Pasteurella multocida* avaliadas.

(conclusão)

Cepa	Origem	Resistência antimicrobiana	Multirresistência
87	Suíno	TIO*, ERY, TET, SOX	Sim
88	Suíno	TIO*, CIP*, ENR*, ERY, TET, SOX, SXT	Sim
89	Suíno	-	-
90	Suíno	SOX	-
91	Suíno	ERY*, SF	-
92	Suíno	SOX	-
93	Suíno	TET, SOX	-
94	Suíno	-	-
95	Suíno	TIO*, ENR*, ERY, TET, SOX, SXT	Sim
96	Suíno	ENR*, ERY, TET*, SOX	Sim

Legenda: AMX= amoxicilina, TIO= ceftiofur, CIP= ciprofloxacina, ENR= enrofloxacina, ERY= eritromicina, GEN= gentamicina, SOX= sulfafurazol, SXT= sulfametoxazol + trimetoprim, TET= tetraciclina.

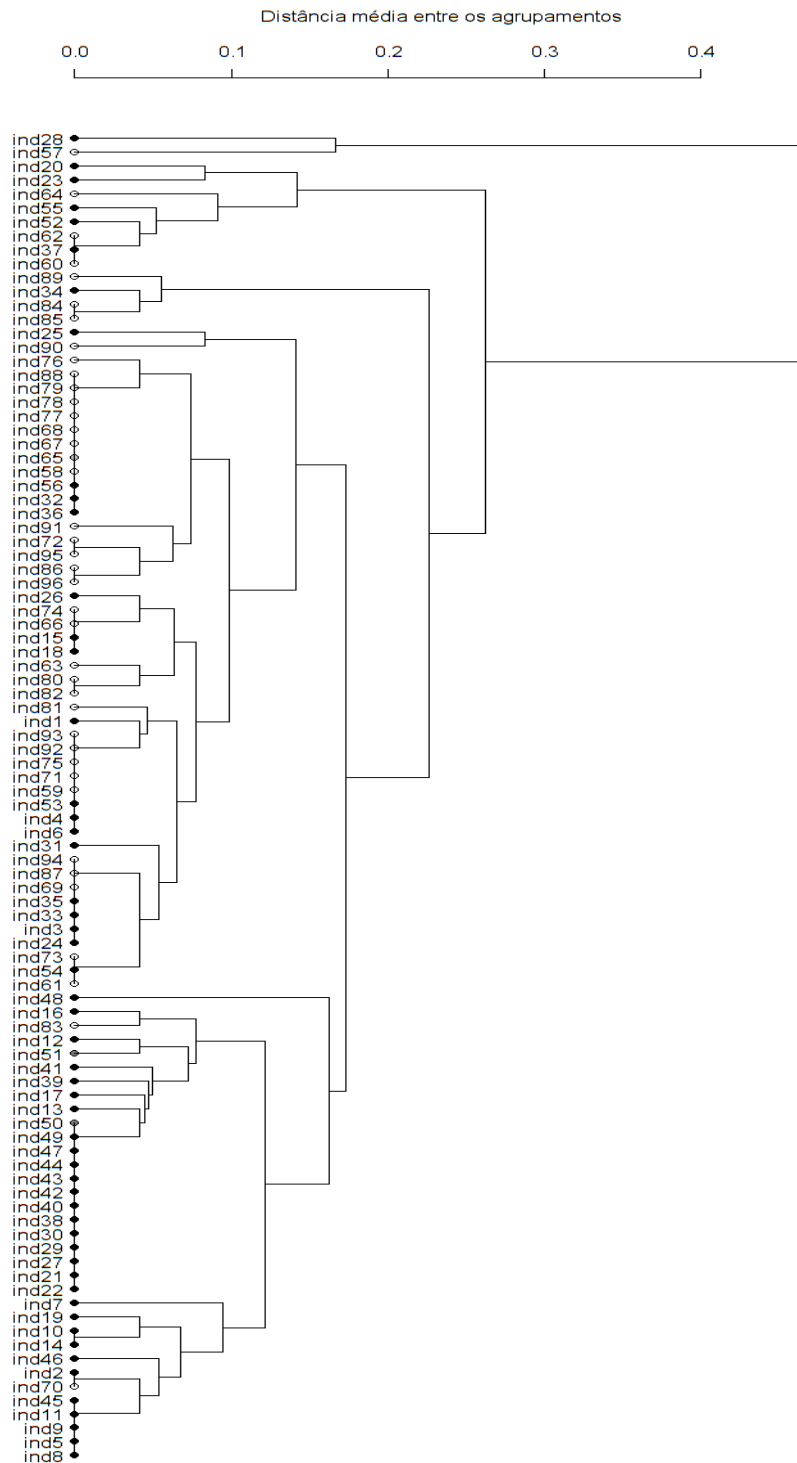
*cepas intermediárias ou parcialmente sensíveis através do teste de disco-difusão em ágar.

APÊNDICE F- Distribuição dos perfis genéticos das 96 cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária e suína conforme a presença ou ausência dos genes analisados.

Perfil genético	Frequência absoluta e relativa (%) (n=96)	Genes ausentes	Hospedeiro
1	16 (16,67%)	<i>toxA; pfhA; dcbF; bcbD; hsf-1</i>	Ave/Suíno
2	13 (13,55%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; hgbB; hsf-1</i>	Ave/Suíno
3	13 (13,55%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; ompA; tadD</i>	Ave
4	9 (9,38%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; hsf-1</i>	Ave/Suíno
5	7 (7,29%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; hsf-1; tadD</i>	Ave/Suíno
6	4 (4,17%)	<i>toxA; pfhA; hyaD-hyaC; bcbD; pmHAS; tadD</i>	Ave/Suíno
7	3 (3,13%)	<i>toxA; pfhA; dcbF; bcbD; hsf-1; hgbB</i>	Ave
8	3 (3,13%)	<i>toxA; pfhA; dcbF; bcbD; hsf-1; tadD</i>	Ave
9	3 (3,13%)	<i>toxA; pfhA; hgbA; nanH; dcbF; bcbD; hgbB</i>	Ave/Suíno
10	2 (2,08%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; hsf-1; ompA; tadD</i>	Ave
11	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; dcbF; bcbD</i>	Suíno
12	1 (1,04%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; hsf-1; pmHAS; tadD</i>	Ave
13	1 (1,04%)	<i>toxA; nanH; dcbF; bcbD</i>	Ave
14	1 (1,04%)	<i>toxA; ptfA; dcbF; bcbD; hsf-1; tadD</i>	Ave
15	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; hyaD-hyaC; bcbD; psl; pmHAS; tadD</i>	Ave
16	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; hgbA; dcbF; bcbD; hgbB</i>	Ave
17	1 (1,04%)	<i>toxA; nanH; dcbF; bcbD; ompA; tadD</i>	Ave
18	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; hyaD-hyaC; dcbF; bcbD; ompA; pmHAS</i>	Ave
19	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; dcbF; bcbD; hsf-1; tadD</i>	Ave
20	1 (1,04%)	<i>toxA; sodA; pfhA; dcbF; bcbD; hsf-1</i>	Ave
21	1 (1,04%)	<i>toxA; fur; dcbF; bcbD; ompA; tadD</i>	Ave
22	1 (1,04%)	<i>toxA; sodC; pfhA; dcbF; bcbD; ompA; tadD</i>	Ave
23	1 (1,04%)	<i>toxA; ptfA; dcbF; bcbD; hsf-1</i>	Ave
24	1 (1,04%)	<i>toxA; nanH; nanB; sodC; fur; exbD-tonB; pfhA; dcbF; bcbD; ompH; ompA; psl; plpB; tadD</i>	Ave
25	1 (1,04%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; ompA</i>	Ave
26	1 (1,04%)	<i>toxA; nanH; sodA; dcbF; bcbD</i>	Ave
27	1 (1,04%)	<i>toxA; dcbF; bcbD; ompH; ompA</i>	Ave
28	1 (1,04%)	<i>toxA; nanH; fur; exbD-tonB; dcbF; bcbD; ompH; ompA; psl; plpB; tadD</i>	Ave
29	1 (1,04%)	<i>toxA; ptfA; dcbF; bcbD; ompA; tadD</i>	Suíno
30	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; nanH; dcbF; bcbD; hsf-1; hgbB</i>	Suíno
31	1 (1,04%)	<i>toxA; dcbF; bcbD</i>	Suíno
32	1 (1,04%)	<i>pfhA; hyaD-hyaC; bcbD; pmHAS; tadD</i>	Suíno
33	1 (1,04%)	<i>toxA; pfhA; hyaD-hyaC; dcbF; bcbD; pmHAS</i>	Suíno

Em destaque os perfis genéticos comuns aos dois hospedeiros.

APÊNDICE I - Dendrograma UPGMA das 96 cepas de *Pasteurella multocida* analisadas conforme a presença e ausência dos 22 genes de virulência.



Legenda: círculo preto corresponde a isolados aviários; círculo branco corresponde a isolados suínos.

ARTIGOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS

Artigo 1

Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR

(Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n. 2, Feb. 2013)

Pesq. Vet. Bras. 33(2):177-182, fevereiro 2013

Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR¹

Thales Q. Furian^{2*}, Karen A. Borges², Silvio L.S. Rocha², Everton E. Rodrigues², Vladimir P. do Nascimento², Carlos T.P. Salle² e Hamilton L.S. Moraes²

ABSTRACT. 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(2):177-182. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: thales.furian@ufrgs.br

The current systems of breeding poultry, based on high population density, increase the risk of spreading pathogens, especially those causing respiratory diseases and those that have more than one host. Fowl Cholera (FC) is one such pathogen, and even though it represents one of several avian diseases that should be considered in the differential diagnosis of notifiable diseases that present with sudden death, the pathogenesis and virulence factors involved in FC are still poorly understood. The objective of this study was to investigate twelve genes related to virulence in 25 samples of *Pasteurella multocida* isolated from FC cases in the southern region of Brazil through the development of multiplex PCR protocols. The protocols developed were capable of detecting all of the proposed genes. The *ompH*, *oma87*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB* and *nanB* genes were present in 100% of the samples (25/25), the *sodA* and *nanH* genes were present in 96% (24/25), *ptfA* was present in 92% (23/25), and *pflA* was present in 60% (15/25). Gene *toxA* was not identified in any of the samples studied (0/25). Five different genetic profiles were obtained, of which P1 (negative to *toxA*) was the most common. We concluded that the multiplex-PCR protocols could be useful tools for rapid and simultaneous detection of virulence genes. Despite the high frequency of the analyzed genes and the fact that all samples belonged to the same subspecies of *P. multocida*, five genetic profiles were observed, which should be confirmed in a study with a larger number of samples.

INDEX TERMS: Fowl cholera, avian pasteurellosis, virulence factors, multiplex-PCR, genetic profile.

RESUMO. [Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* isoladas em casos de cólera aviária através da técnica de multiplex-PCR.] Os atuais sistemas de criação na avicultura, baseados na alta densidade populacional, aumentam os riscos de disseminação de patógenos, especialmente das doenças respiratórias e daquelas cujos agentes etiológicos possuam mais de um hospedeiro. A Cólera Aviária (CA) apresenta estas características e apesar de representar uma das patologias aviárias que deve ser considerada para o diagnóstico

diferencial de enfermidades com notificação obrigatória que cursam com morte súbita, a patogenia e os fatores de virulência envolvidos na CA ainda estão pouco elucidados. O objetivo deste trabalho foi pesquisar doze genes associados à virulência em 25 amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de CA na região sul do Brasil através do desenvolvimento de protocolos de multiplex-PCR. Os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos foram capazes de detectar todos os genes propostos. Os genes *ompH*, *oma87*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *nanB* estiveram presentes em 100% das amostras (25/25). Os genes *sodA* e *nanH* em 96% (24/25), o gene *ptfA* em 92% (23/25) e o gene *pflA* em 60% (15/25). O gene *toxA* não foi identificado em nenhuma das amostras pesquisadas (0/25). Foram obtidos cinco diferentes perfis genéticos, sendo P1 (negativo para o gene *toxA*) o mais comum. Com este trabalho, concluiu-se

¹ Received on October 19, 2012.

Accepted for publication on November 21, 2012.

² Centro de Diagnóstico e Pesquisa Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. *Corresponding author: thales.furian@ufrgs.br

Artigo 2

Identification of the capsule type of *Pasteurella multocida* isolates from cases of fowl cholera by multiplex PCR and comparison with phenotypic methods

(Brazilian Journal of Poultry Science, v. 16, n. 2, Apr./June 2014)

Brazilian Journal of Poultry Science
Revista Brasileira de Ciência Avícola

ISSN 1516-635X Apr - Jun 2014 / v.16 / n.2 / 31-36

<http://dx.doi.org/10.1590/1516-635x160231-36>

Identification of The Capsule Type of *Pasteurella Multocida* Isolates from Cases of Fowl Cholera by Multiplex PCR and Comparison with Phenotypic Methods

Author(s)

Furian TQ¹
Borges KA¹
Pilatti RM¹
Almeida C¹
Nascimento VP do¹
Salle CTP¹
Moraes HL de S¹

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Avícola, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Mail Address

Corresponding author e-mail address: Thales Quedi Furian
Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Avícola (CDPA)
Faculdade de Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Tel: 51 33086130
E-mail: thales.furian@ufrgs.br

Keywords

Molecular diagnosis; non-serologic tests; *Pasteurellosis*; serogroup.

ABSTRACT

The ability of *Pasteurella multocida* to invade and multiply in its host is enhanced by the presence of the capsule, one of the most important virulence factors for this bacterium. Capsular typing methods are often used in epidemiological and pathogenesis studies of this agent. Five different serogroups have been identified based on serological typing. However, such tests are laborious, and agglutination of homologous antiserum may fail. The aim of this study was to develop a multiplex PCR protocol for the identification of the *hyaD-hyaC* and *dcbF* genes specific to serogroups A and D, respectively, and to compare these results with those of phenotypic tests for 54 strains isolated from fowl cholera cases in southern Brazil. The kappa coefficient and chi-square statistics were calculated to assess the agreement between the diagnostic methods and to determine the significance of the results, respectively. The multiplex PCR was able to detect the evaluated genes. Forty-nine strains (90.74%) were classified into serogroup A, and only two isolates (3.7%) were not identified as belonging to any of the serogroups analyzed. In contrast, with the phenotypic tests, only 41 strains (75.93%) were classified into serogroup A and 11 samples (20.37%) were unidentifiable. Of the strains analyzed, 70.37% were classified into the same serogroup (A) by both methods, and the kappa coefficient ($k = 0.017$) indicated poor agreement between the tests. Thus, multiplex PCR is an alternative for *P. multocida* capsular typing, as it allows the simultaneous and rapid detection of genes and also provides a greater strain-typing capacity.

INTRODUCTION

Members of the family *Pasteurellaceae* are implicated in a number of diseases, many of which with respiratory signs (Nascimento *et al.*, 2009). One member of this family, *Pasteurella multocida*, is the causative agent of multiple different diseases that have great economic impact on animal production, including hemorrhagic septicemia in cattle, atrophic rhinitis in swine and fowl cholera (FC) in domesticated and wild birds (Harper *et al.*, 2006; Glisson, 2008; Rigobelo *et al.*, 2013).

The ability of *P. multocida* to invade and multiply within the host is enhanced by the presence of its capsule, a polysaccharide structure that is one of the most important virulence factors for this species (Wilkie *et al.*, 2012). Functions assigned to the capsule include desiccation resistance, antiphagocytic activity and interaction with the complement system (Boyce *et al.*, 2000). Additionally, there are conflicting reports in the literature regarding the possible role of capsule in the adhesion to host cells and tissues (Harper *et al.*, 2012). The importance of the capsule in *P. multocida* adherence possibly depends on its strain and host cell type (Pruimboom *et al.*, 1996).

Submitted: December/2013
Approved: April/2014

Artigo 3

Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine(Brazilian Journal of Microbiology – accepted for publication on June 24th, 2015)

Brazilian Journal of Microbiology

Decision Letter (BJM-2014-0878.R2)

From: mbmartin@usp.br**To:** thales.furian@ufrgs.br, furian@terra.com.br**CC:****Subject:** Brazilian Journal of Microbiology - Decision on Manuscript ID BJM-2014-0878.R2**Body:** 24-Jun-2015

Dear Mr. Quedi Furian:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* from poultry and swine" in its current form for publication in the Brazilian Journal of Microbiology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Publication will be delayed until the text has undergone an English language review. Please send us the text and the certificate of revision issued by the "American Journal Experts" or "Sci-Edit" as quickly as possible.

Send to bjm@sbmicrobiologia.org.br and attach the revision Manuscript and the certificate of revision

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Brazilian Journal of Microbiology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Marina Martinez
Editor-in-Chief, Brazilian Journal of Microbiology
mbmartin@usp.br

Associate Editor Comments to Author:

Associate Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Date Sent: 24-Jun-2015

Artigo 3

Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine(Brazilian Journal of Microbiology – accepted for publication on June 24th, 2015)**Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine**Thales Q. Furian¹, Karen A. Borges¹, Vanessa Laviniki¹, Silvio L. S. da Rocha¹, Camila N. de Almeida¹, Vladimir P. do Nascimento¹, Carlos T. P. Salle¹, Hamilton L.S. Moraes¹¹ 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**ABSTRACT**

Pasteurella multocida causes atrophic rhinitis in swine and fowl cholera in birds, and is a secondary agent in respiratory syndromes. Pathogenesis and virulence factors involved are still poorly understood. The aim of this study was to detect 22 virulence-associated genes by PCR, including capsular serogroups A, B and D genes and to evaluate the antimicrobial susceptibility of *P. multocida* strains from poultry and swine. *ompH*, *oma87*, *plpB*, *psl*, *exbD-tonB*, *fur*, *hgbA*, *nanB*, *sodA*, *sodC*, *pfxA* were detected in more than 90% of the strains of both hosts. 91% and 92% of avian and swine strains, respectively, were classified in serogroup A. *toxA* and *hsf-1* showed a significant association to serogroup D; *pmHAS* and *pfnA* to serogroup A. Gentamicin and amoxicillin were the most effective drugs with susceptibility higher than 97%; however, 76.79% of poultry strains and 85% of swine strains were resistant to sulphonamides. Furthermore, 19.64% and 36.58% of avian and swine strains, respectively, were multi-resistant. Virulence genes studied were not specific to a host and may be the result of horizontal transmission throughout evolution. High multidrug resistance demonstrates the need for responsible use of antimicrobials in animals intended for human consumption, in addition to antimicrobial susceptibility testing to *P. multocida*.

Key-words: pasteurellosis, virulence factors, multiplex-PCR, antimicrobial susceptibility

INTRODUCTION

Pasteurella multocida is a normal inhabitant of the respiratory tract of healthy animals (Samuel *et al.*, 2007); however, it is an enigmatic pathogen known for being associated with a diversity of respiratory syndromes that can affect a range of host species (Wilkie *et al.*, 2012). Moreover, it is either the primary causative agent or presents a major role in the evolution of certain diseases of economic impact, such as atrophic rhinitis in pigs and fowl cholera (FC) in avian species (Wilkie *et al.*, 2012).

The variability of the clinical signs in cases of pasteurellosis is possibly explained by the alteration of the commensal relationship between host and bacteria, as well as by the presence of virulence factors that differ several variants of one species of this pathogenic microorganism (Samuel *et al.*, 2007; Vieira, 2009). Some molecular studies have been developed to identify genes related to virulence in *P. multocida*, but little is known regarding the virulence gene content between *P. multocida* strains in different

animal hosts (Ewers *et al.*, 2006; Bethe *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009). The capsule is one of the major virulence factors identified in *P. multocida* (Harper *et al.*, 2006), and the genes required for the synthesis and transport of these capsular types are encoded within a single region of the genome (Townsend *et al.*, 2001). All strains can be classified into five different capsular types or serogroups (A, B, D, E and F) according to the presence of capsular antigens (Harper *et al.*, 2006).

Although the strains are generally susceptible to the majority of antimicrobials (Huang *et al.*, 2009), the increased incidence of multidrug-resistant pathogenic bacteria has been widely reported in the last several decades (Tang *et al.*, 2009). Compared with human specific pathogens, even less data are available on resistance patterns in pathogens exclusively found in food animals (Wassenaar and Silley, 2008). However, the knowledge and the control of antibiotic treatment in *P. multocida* are important,

Artigo 4

Caracterização de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de cólera aviária e identificação de genes associados com a patogenicidade

(artigo a ser submetido)

Caracterização de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de cólera aviária e identificação de genes associados com a patogenicidadeThales Q. Furian^{1*}, Karen A. Borges¹, Roberta M. Pilatti¹, Camila Almeida², Suelle V. Rodrigues³, Brunna D. de Emery³, Vladimir P. do Nascimento; Carlos T. P. Salle⁴, Hamilton L. de S. Moraes⁴¹Médico Veterinário MSc., aluno de doutorado, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária (FAVET); Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil²Graduanda em Medicina Veterinária, bolsista iniciação científica, CDPA, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil³Médica Veterinária, aluna de mestrado, CDPA, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil⁴Médico Veterinário PhD., Professor, CDPA, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

*autor para correspondência: thales.furian@ufrgs.br

RESUMO: Além de ser o agente causador da cólera aviária nas aves, a bactéria *Pasteurella multocida* também se constitui em um dos microrganismos comensais ou patógenos oportunistas mais prevalentes, especialmente envolvido em enfermidades respiratórias em distintos hospedeiros. Contudo, o conhecimento sobre a patogenia desta bactéria ainda é restrito, assim como a identificação de fatores de virulência relacionados com a variabilidade da manifestação clínica nas aves. O objetivo deste trabalho foi a caracterização fenotípica de 56 cepas de *P. multocida* através da classificação da subespécie e do biovar dos isolados e a caracterização molecular das cepas por PCR-RFLP a partir da análise dos genes *ompH* e *oma87*. Por último, 22 genes de virulência anteriormente pesquisados foram relacionados com os índices de patogenicidade *in vivo* das cepas também obtidos em estudos anteriores. Dentre os 56 isolados de origem aviária, 87,5% (49/56) das cepas foram classificados na subespécie *multocida*, ocorrendo diferença significativa ($p < 0,001$) em relação à frequência das subespécies *septica* e *gallicida*. O biovar 3, seguido dos biovars 13 e 9, foram os mais comuns, sendo identificados em 35,7% (20/56), 23,2% (13/56) e em 12,5% (7/56) dos casos, respectivamente. O PCR-RFLP a partir do gene *ompH* permitiu a classificação dos isolados em sete grupos, sendo predominante o grupo II (42,11%), enquanto a mesma técnica a partir do gene *ompA* gerou um único perfil para todos as cepas. A ausência do gene *pflA* indicou a presença de cepas de patogenicidade intermediária e, em segundo lugar, de cepas de baixa patogenicidade. Por outro lado, a presença do mesmo gene indicou a ocorrência de cepas de patogenicidade alta e, em segundo lugar, de cepas intermediárias. O protocolo de PCR-RFLP foi capaz de caracterizar os isolados e consiste em uma alternativa na análise da diversidade das cepas em estudos de epidemiologia molecular. O *screening* de detecção dos 22 genes de virulência e de inferência através dos modelos de árvores de decisão, comparando-se os índices de patogenicidade anteriormente formulados, permite a identificação das cepas mais patogênicas de *P. multocida*.

Palavras-chave: pasteurelose, gene *ompH*, aves, marcador patogênico

INTRODUÇÃO: A bactéria *Pasteurella multocida* é um patógeno enigmático conhecido pela diversidade de síndromes em que está associada e pela grande extensão de hospedeiros que pode acometer (WILKIE; HARPER; ADLER, 2012). Entre as centenas de bactérias que habitam a cavidade oral e nasal dos animais, os constituintes da família *Pasteurellaceae* estão entre os microrganismos comensais ou patógenos oportunistas mais prevalentes, especialmente envolvidos em enfermidades respiratórias (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; WILSON; HO, 2013). Além disto, são agentes primários

ou que apresentam o principal papel na evolução de determinadas doenças. Entre estas, *P. multocida* é o agente causador da septicemia hemorrágica em bovinos, da rinite atrófica em suínos, além da CA em aves, todas doenças de grande impacto econômico nos animais (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; GLISSON, 2008; WILKIE; HARPER; ADLER, 2012).

A biotipificação pode apresentar um menor valor em estudos epidemiológicos quando comparada com outras técnicas moleculares, contudo consiste no método mais tradicional para identificação de uma espécie bacteriana