

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

**CLASSIFICAÇÃO DA SUBESPÉCIE E DO BIOVAR DE ISOLADOS DE *Pasteurella*
multocida DE ORIGEM AVIÁRIA ATRAVÉS DE TESTES BIOQUÍMICOS E
PESQUISA DA PRESENÇA DO GENE *exBD-tonB***

Autora: Suelle Vencato Rodrigues

Porto Alegre

2013

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

**CLASSIFICAÇÃO DA SUBESPÉCIE E DO BIOVAR DE ISOLADOS DE *Pasteurella
multocida* DE ORIGEM AVIÁRIA ATRAVÉS DE TESTES BIOQUÍMICOS E
PESQUISA DA PRESENÇA DO GENE *exBD-tonB***

Autora: Suelle Vencato Rodrigues

Monografia apresentada como requisito parcial
para graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Co-orientador: Msc. Thales Quedi Furian

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, capacidade, paciência, iluminação e por ter posto pessoas maravilhosas no meu caminho, que de alguma forma colaboraram para que eu chegasse até esse momento.

Aos meus pais, Márcia e Simão, por todo o amor, apoio, educação e por terem me proporcionado condições para que eu pudesse me dedicar somente à faculdade.

Aos meus irmãos, Simone e Mateus, pelo carinho, paciência e companheirismo que tiveram comigo.

Ao meu namorado, Danilo, todo o carinho, apoio, e estímulo. que foram fundamentais para que essa etapa fosse concluída.

Aos professores, funcionário, estagiário e pós-graduandos do CDPA pelos ensinamentos e ajuda durante o meu tempo de estágio.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle pelas conversas e orientação.

Em especial ao Thales por todo o conhecimento compartilhado, pela co-orientação e pela grande ajuda com o experimento.

A Preta, minha gata com paciência de cão, por te aparecido na minha vida e mostrado o quão amorosos e companheiros são os animais, dando-me a certeza de estar na profissão certa.

RESUMO

Pasteurella multocida é um bactéria gram-negativa causadora de diversas doenças de importância econômica, incluindo-se rinite atrófica em suíno, septicemia hemorrágica em ungulados, doenças respiratórias em coelhos e cólera aviária (CA) em aves. A CA deve ser considerada como diagnóstico diferencial de doenças de notificação obrigatória que cursam com morte súbita. A caracterização fenotípica é uma ferramenta de diagnóstico demorada e pouco empregada, mas que apresenta grande importância para obtenção de dados epidemiológicos e melhor conhecimento das propriedades do patógeno estudado. Os objetivos deste estudo foram a identificação, através de testes bioquímicos, da subespécie e do biovar a que pertencem 59 estirpes de *P. multocida* isolados de casos clínicos de CA, além da detecção do gene *Exbd-tonB*, envolvido no mecanismo de aquisição de ferro, através de PCR. A maioria dos isolados analisados pertence à subsp. *multocida* (52), destes 21 cepas pertencem ao biovar 3, o qual foi o mais frequente, cinco ao biovar 1, quatro ao biovar 2, oito ao biovar 9 e 14 cepas ao biovar 13. A subespécie *septica* foi identificada em seis isolados, que foram classificados nos biovars 5, 7 e 10. Apenas um isolado foi identificado na subespécie *gallicida* e este pertence ao biovar 8. O gene *exBD-tonB* foi amplificado em 100% das cepas do estudo. A alta frequência do gene *exBD-tonB* observada no estudo e em trabalhos anteriores sugere que este gene pode ser usado em protocolos de PCR para o diagnóstico molecular em casos suspeitos de CA.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, Cólera Aviária, biovar, PCR, gene *exBD-tonB*

ABSTRACT

Pasteurella multocida is a gram-negative bacteria causative of various diseases that are of significant economic importance including atrophic rhinitis in swine, hemorrhagic septicemia in ungulates, respiratory diseases in rabbits and fowl cholera (FC) in bird. The FC should be considered in the differential diagnosis in notifiable diseases that present with sudden death. Phenotypic characterization is a time-consuming diagnosis and rarely used, but it has great importance for obtaining epidemiological information and better knowledge of the properties of the target pathogen. The objectives of this study were to identify, through biochemical tests, the subspecies and biovars of 59 strains of *P. multocida* isolated from clinical cases of FC, besides the detection of the gene *exBD-tonB*, involved in the iron uptake mechanisms, through PCR. Fifty-two of the isolates belong to *P. multocida* ssp. *multocida*, of these 21 were biovar 3, which was the most frequent. The other biovars that were identified and belong to subspecies *multocida* were biovar 1 with five isolates, biovar 2 with four isolates, biovar 9 with eight isolates and biovar 13 with 14 isolates. The subspecies *septica* had six strains that belong to biovar 5, 7 and 10. The subspecies *gallicida* had only one isolate that belongs to the biovar 8. The *exBD-tonB* gene was amplified in 100% of strains of the study. The high frequency of *exBD-tonB* gene observed in the study and in previous studies suggest that this gene can be used in PCR protocols for molecular diagnosis in suspected cases of FC.

Key-words: *Pasteurella multocida*, Fowl Cholera, biovar, PCR, *exBD-tonB* gene

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características bioquímicas dos biovares de <i>Pasteurella multocida</i> | 18 |
| Tabela 2 - Protocolo de PCR: Composição e concentração dos componentes do mix | 19 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Testes Fenotípicos A: Teste de fermentação de carboidratos. B Teste de descarboxilação do aminoácido ornitina. | 17 |
| Figura 2 - Distribuição dos isolados de acordo com a subespécie a partir da fermentação dos açúcares sorbitol e dulcitol. | 20 |
| Figura 3 - Distribuição dos isolados de acordo com o biovar através da caracterização fenotípica | 21 |
| Figura 4 - Visualização dos produtos amplificados em eletroforese em gel de agarose a 1% | 21 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| °C | Graus Celsius |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura |
| BHI | <i>Brain-Heart Infusion</i> - Infusão Cérebro-Coração |
| CA | Cólera Aviária |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo trifosfatado |
| kg | Quilograma |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| min | Minuto(s) |
| µm | Micrometro |
| mL | Mililitro |
| µL | Microlitros |
| pb | Pares de base |
| PIB | Produto Interno Bruto |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| rpm | Rotações por minuto |
| RS | Rio Grande do Sul |
| s | Segundo (s) |
| µL | Microlitro |
| UBABEF | União Brasileira de Avicultura |
| CDPA | Centro de Diagnósticos e Pesquisa em Patologia Aviária |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| MgCl ² | Cloreto de Magnésio |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus Aquaticus</i> |
| PMT | <i>Pasteurella multocida Toxin</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|--|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 | <i>Pasteurella multocida</i> | 11 |
| 2.2 | Cólera Aviária | 13 |
| 2.3 | Fatores de virulência | 14 |
| 2.4 | Diagnóstico | 14 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.14 |
| 3.1 | Isolados de <i>Pasteurella multocida</i> | 15 |
| 3.2 | Reativação das Amostras | 15 |
| 3.3 | Caracterização Fenotípica | 16 |
| 3.3.1 | Preparo dos meios dos testes bioquímicos..... | 16 |
| 3.3.2 | Realização dos testes bioquímicos..... | 17 |
| 3.4 | Pesquisa do Gene <i>ExbD-tonB</i> através de PCR..... | 18 |
| 3.4.1 | Extração do DNA | 18 |
| 3.4.2 | Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 19 |
| 4.1 | Determinação da Subespécie | 20 |
| 4.2 | Determinação do Biovar..... | 20 |
| 4.3 | Pesquisa do Gene <i>exBD-tonB</i>..... | 21 |
| 5 | DISCUSSÃO | 22 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 24 |
| | REFERÊNCIAS | 25 |

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira está em constante desenvolvimento. Segundo o Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura (UBABEF) de 2013, o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango e o maior exportador mundial do setor. Em 2012 foram produzidos 12,645 milhões de toneladas, houve uma redução de 3,17% em relação ao ano anterior. Da produção total de carne de frango, 69% são destinados ao mercado interno para suprir o consumo per capita de 45kg de carne de frango por ano. Em 2012 foram exportados 3,918 milhões de toneladas do produto o que significou uma pequena retração de 0,6% em relação a 2011. Entretanto, há grandes chances de expansão dos produtos de exportação brasileira nos próximos anos, principalmente devido ao crescimento econômico dos países subdesenvolvidos, que terá por consequência uma maior demanda por proteína de qualidade e de baixo custo. O Brasil apresenta todos os fatores para liderar o fornecimento de carne de frango para esses países, pois possui grandes extensões de terra, alta produção de grãos, mão de obra barata e tecnologia no setor (UBABEF, 2013).

O aumento constante dos volumes de produção agrícola resulta em uma grande intensificação da avicultura industrial. Essa intensificação predispõe ao maior aparecimento de doenças, especialmente as respiratórias como cólera aviária (CA). A CA é uma doença aguda e septicêmica, que afeta aves domésticas e silvestres de todas as idades e deve ser considerada no diagnóstico diferencial de doenças de notificação obrigatória com morte súbita.

O agente da CA é a *Pasteurella multocida*, uma bactéria gram-negativa que pertence à família das *Pasteurellaceae*. Desta família fazem parte os gêneros *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Avibacterium*, *Actinobacillus*, entre outros. A gravidade e a incidência da *P. multocida* é dependente de fatores tanto associados com o hospedeiro (incluindo espécie e idade das aves infectadas), quanto do ambiente e da cepa envolvida (CHRISTENSEN & BISGAARD, 2000). A bactéria *P. multocida* é dividida em três subespécies (*multocida*, *septica* e *gallicida*). Baseando-se nas diferentes habilidades de fermentação de carboidratos das cepas de *P. multocida*, Fegan et al. (1995) e Blackall et al. (1997) classificaram-nas em 13 biovars distintos.

Embora a CA seja uma doença de importância econômica, poucos estudos têm sido realizados, no Brasil, para melhor caracterização e conhecimento do agente da doença a *P. multocida*. Portanto, os objetivos do atual estudo são: a identificação através de testes bioquímicos da subespécie e do biovar a que pertencem às cepas de *P. multocida* isolados de

casos clínicos de CA; além da detecção do gene *exBD-tonB* envolvido no mecanismo de aquisição de ferro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os primeiros estudos sobre a doença foram realizados em 1782 por Chabert, contudo o nome cólera aviária (CA) começou a ser utilizado em 1836 pelo pesquisador francês Maillet. Posteriormente, Perroncinto (1877) e Semmer (1878) observaram uma bactéria com formas arredondadas, que ocorria tanto sozinha como em pares nos tecidos de aves afetadas pela enfermidade. Neste mesmo período, Bollinger associou esse microrganismo a um agente que causava septicemia hemorrágica em aves silvestres e bovinos. Em 1879, Toussaint efetuou o isolamento da bactéria e provou que esta causava CA (LIMA & ANDREATTI, 2007; NASCIMENTO et al., 2009). No entanto, dois anos depois foi Pasteur quem fez a primeira descrição completa da bactéria *P. multocida*, como agente causador da CA (HARPER et al., 2006).

2.1 *Pasteurella multocida*

Esta bactéria pertence ao gênero *Pasteurella*, o qual faz parte da família das *Pasteurellaceae*. Outros 10 gêneros também pertencem a esta família, entre estes temos: *Avibacterium*, *Actinobacillus* e *Haemophilus* (NASCIMENTO et al., 2009). Esses microrganismos são os agentes de várias doenças com significativa importância econômica para a pecuária, incluindo-se CA nas aves, septicemia hemorrágica em ungulados, rinite atrófica em suínos (BOYCE et al., 2010) e doenças respiratórias em coelhos (STAHEL et al., 2009).

P. multocida é um bastonete gram-negativo, não hemolítico, aeróbio e anaeróbio facultativo, que pode ocorrer sozinha ou em pares. A bactéria é imóvel, não formadora de esporos e possui um tamanho entorno de 0,25-0,4µm de largura por 0,6-2,6µm de comprimento. Depois de repetidos cultivos em ágar, a bactéria pode tornar-se pleomórfica (LIMA & ANDREATTI, 2007; GLISSON et al., 2008). A presença da cápsula pode ser demonstrada através de métodos indiretos de coloração. Quando esfregaços de sangue ou tecido são corados com azul de metileno ou fucsina fenicada, a bactéria aparece com a coloração bipolar típica (NASCIMENTO et al., 2009).

A temperatura ótima de crescimento da *P. multocida* é de 37°C e o pH ideal é entre 7,2-7,8, porém pode haver crescimento em pH de 6,2 a 9,0 (GLISSON et al., 2008). A bactéria é catalase e oxidase positivas, pode fermentar glicose e outros açúcares com a formação de ácido, mas não de gás. Também pode crescer em meios de enriquecimento

comuns, como infusão de cérebro e coração e em meios que contenham sangue de ruminante, entretanto não cresce em ágar MacConkey ou citrato de Simmons (BOYCE et al., 2010).

O formato das colônias de *P. multocida* podem variar de cepa para cepa de acordo com a presença de cápsula, composição dos meios de cultivo e do hospedeiro de origem. Geralmente as colônias são iridescentes, circulares, lisas, convexas, translúcidas e brilhantes. Algumas cepas podem produzir colônias grandes e com aspecto mucoso (LIMA & ANDREATTI, 2007). Colônias iridescentes são geralmente encapsuladas e cepas que apresentam cápsulas são frequentemente as mais patogênicas (GLISSON et al., 2008).

A bactéria *P. multocida* é subdividida em três subespécies: *multocida*, *séptica* e *gallicida*. Estas subespécies são classificadas de acordo com as diferentes habilidades em produzir ácido a partir dos açúcares sorbitol e dulcitol e de acordo com a homologia do DNA (MUTTERS et al., 1985; STAHEL et al., 2009). Os isolados de *P. multocida* mostram habilidades diferentes na fermentação de um grupo de carboidratos. Baseando-se nessa diferença, Fegan et al. (1995) descreveram 10 biovars em cepas isoladas de aves. Em semelhante pesquisa, Blackall et al. (1997) descreveram mais quatro biovars seguindo o mesmo princípio.

Pelo fato de se isolar a bactéria da flora normal do trato respiratório e digestivo de muitas espécies de animais sadios, tem-se duvidado da importância do microrganismo como de patógeno primário (NASCIMENTO et al., 2009). Desse modo, como um patógeno secundário, *P. multocida* depende de vários fatores durante o processo infeccioso como: espécie e idade do hospedeiro, patogenicidade da cepa, fatores ambientais (temperatura e umidade) ou de manejo (densidade, condições de estresse), além de imunossupressão, má nutrição ou infecções intercorrentes envolvidas (KNÖBL, 2009).

Os isolados de *P. multocida* podem ser classificados em cinco sorogrupos (A, B, D, E e F) com base nos antígenos capsulares presentes e, também, podem ser classificados em 16 sorotipos (1-16) com base nos antígenos dos lipopolisacarídeos. Os sorogrupos A e F são tipicamente associados com CA (HARPER et al., 2006) e o sorogrupo A costuma ser o mais frequentemente isolado nos casos severos de CA (CRHISTENSEN & BISGAARD, 2000). Sorogrupos B e E são mais associados com septicemia hemorrágica em bovinos e o sorogrupo D com cepas que expressam toxina PMT em casos de rinite atrófica em suínos (HARPER et al., 2006).

2.2 Cólera Aviária

A CA é uma patologia contagiosa que afeta aves domésticas e silvestres. A forma aguda da doença ocorre tipicamente com lesões características de septicemia (hiperemia, congestão generalizada, petéquias ou hemorragias em diferentes órgãos) e com morte súbita. Nestes casos geralmente ocasiona uma alta morbidade e mortalidade. Devido a essas características a CA deve ser considerada no diagnóstico diferencial de outras doenças infectocontagiosas que cursam com morte súbita, especialmente aquelas de notificação obrigatória. A CA também pode persistir como uma doença crônica, ocasionando artrite, pneumonia, inflamação de crista e barbelas (CRHISTENSEN & BISGAARD, 2000; NASCIMENTO et al, 2009). As aves afetadas por CA podem apresentar como sintomas febre, anorexia, penas arrepiadas, diarreia, aumento da frequência respiratória, cianose e descarga mucosa bucal, nasal e auricular (BLACKALL et al., 2000; CRHISTENSEN & BISGAARD, 2000).

A CA ocorre esporadicamente na maioria dos países. Algumas vezes causa grande mortalidade e, em outras, as perdas são pouco significativas (GLISSON et al., 2008). Os perus são mais sensíveis à infecção do que as galinhas, e dentre estas, as aves com idade entre 16-40 semanas são as mais suscetíveis (NASCIMENTO et al, 2009). Em um estudo realizado por Petersen et al. (2010) que consistia na inoculação intratraqueal de cepas *P. multocida* subsp. *multocida* em perus, perdizes, faisões e galinhas, as perdizes e faisões demonstraram ser tão suscetíveis quanto os perus na severidade dos sinais clínicos.

É impossível determinar como a CA é introduzida em uma granja. A transmissão é horizontal e aves cronicamente infectadas são consideradas a maior fonte de infecção. No entanto, a transmissão pode ocorrer por meio da contaminação da água e do alimento com secreções ou através do contato com roedores, gatos e outros mamíferos portadores de *P. multocida* (GLISSON et al., 2008).

A entrada dos patógenos geralmente ocorre pelas mucosas digestivas ou respiratórias, mas também através da conjuntiva ou das lesões cutâneas. A via de infecção é geralmente a respiratória superior. Após a infecção, a bactéria se multiplica na orofaringe e se dissemina a outros órgãos, atingindo os pulmões. Neste local multiplica-se antes de entrar na corrente sanguínea. Uma vez na circulação sanguínea, o microrganismo pode multiplicar-se rapidamente, infectar o fígado ou baço (LIMA & ANDREATTI, 2007; KNÖBL, 2009). A morte, decorrente da CA, é causada provavelmente devido a uma bacteremia massiva e pelo choque endotóxico (HARPER et al., 2006).

2.3 Fatores de virulência

A patogenia nas infecções causadas por *Pasteurella* spp. em aves é pouco esclarecida. Entretanto, há o reconhecimento que a incidência e a severidade da doença podem variar conforme o hospedeiro, o ambiente e a cepa bacteriana. Em geral, isolados de *P. multocida* que possuem cápsula são mais virulentos que as variantes que não são encapsuladas. Tal diferenciação ocorre porque a cápsula desempenha um importante papel na resistência à fagocitose. A produção de endotoxinas nos casos septicêmicos severos também está associada à patogenicidade da bactéria. O lipopolissacarídeo (LPS) é muito importante para patogenia, a *P. multocida* requer que a estrutura do LPS esteja completa para poder se multiplicar e causar a doença. O LPS também age como uma endotoxina, mas sua toxicidade varia de hospedeiro para hospedeiro. Além disso, a exotoxina dermonecrótica (PMT) presente nos casos de rinite atrófica suína também está relacionada às lesões geradas na CA. Por outro lado, fimbrias e adesinas atuam na adesão, da bactéria, à superfície epitelial da mucosa do hospedeiro (CRHISTENSEN & BISGAARD, 1997; HARPER et al., 2006; BOYCE et al., 2010).

O ferro é um elemento essencial para sobrevivência da bactéria. Contudo, o ferro livre é uma substância pouco solúvel e tóxica para organismo, logo, está disponível em concentrações baixas nos seres vivos. Para competir por esse nutriente limitado, as bactérias desenvolveram uma variedade de mecanismos para aquisição de ferro. Esses mecanismos, por estarem associados à persistência da bactéria no hospedeiro, são indiretamente relacionados aos fatores de virulência. O sistema de captação de ferro requer a presença de uma proteína na membrana externa de *P. multocida* que funcione como um receptor específico, uma proteína ligante presente no periplasma, além de um complexo energético para o processo. A energia do sistema é suprida pelo Complexo TonB, o qual é formado pelas proteínas TonB, ExbB e ExbD que estão ancoradas na membrana interna de *P. multocida* (MAY et al., 2001; CRHISTENSEN & BISGAARD, 2006; HARPER et al., 2006; BOYCE et al., 2010; FURIAN et al., 2013).

2.4 Diagnóstico

Em casos de suspeita de CA, os tecidos de eleição que podem ser coletados para o isolamento bacteriano são: medula óssea, sangue cardíaco, fígado, meninges e lesões localizadas. No caso de aves vivas, pode ser coletado o muco nasal, inserindo-se um swab na

fenda nasal ou apertando a narina para que ocorra a exposição do muco (GLISSON et al., 2008).

O diagnóstico também pode ser realizado através da inoculação do material suspeito em camundongos pelas vias intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular. Se a bactéria estiver presente, a morte do animal ocorrerá em 24 a 48 horas após a inoculação e culturas puras da bactéria podem ser obtidas do baço, do fígado e do sangue cardíaco (GLISSON et al., 2008; DZIVA et al, 2008).

O diagnóstico presuntivo da CA é geralmente realizado através da associação entre os sinais clínicos, as lesões encontradas na necropsia e achados laboratoriais mínimos que incluem morfologia da colônia, odor característico, coloração bipolar da bactéria, as reações positivas nos testes de catalase e oxidase e a inibição do crescimento em Ágar McConkey (DZIVA et al, 2008; NASCIMENTO et al, 2009).

Existe uma vasta gama de testes bioquímicos para a correta identificação fenotípica da bactéria *P. multocida* (DZIVA et al, 2008). As subespécies podem ser identificadas através das diferentes habilidades em produzir ácido a partir dos açúcares sorbitol e dulcitol, e de acordo com a homologia do DNA (MUTTERS et al., 1985; STAHEL et al., 2009). Inicialmente a caracterização fenotípica através de testes bioquímicos determinava que todas as *P. multocida* eram indol e ornitina descarboxilase positivas e a distinção entre as subespécies se baseava na diferença de fermentação dos carboidratos sorbitol e dulcitol. Porém Fegan et al. (1995) notou que as cepas de *P. multocida* apresentavam variação quanto à descarboxilação da ornitina e dividiu as estas cepas em 10 biovars e posteriormente Blackall et al. (1997) adicionou mais três biovars. Os testes bioquímicos para classificação em biovars baseiam-se na descarboxilação do aminoácido ornitina e na fermentação de seis carboidratos (dulcitol, lactose, maltose, sorbitol, trealose e xilose).

3.1 Isolados de *Pasteurella multocida*

Para o presente experimento foram selecionados 59 isolados de *P. multocida* provenientes de casos clínicos de CA. As amostras encontravam-se estocadas em sangue total ovino à temperatura de -80°C e pertencem à bacterioteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA).

3.2 Reativação das Amostras

A reativação e os testes preliminares de confirmação das cepas puras de *P. multocida* foram procedidos conforme o método descrito por Glisson et al. (2008). Primeiramente, os isolados foram inoculados em caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion – BHI - Oxoid®), um meio não seletivo de enriquecimento, e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, as cepas foram semeadas por esgotamento em ágar sangue (Oxoid®) e novamente incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. As colônias presentes no ágar sangue foram avaliadas conforme sua morfologia e, em seguida, coradas com azul de metileno para observar a característica bipolar da célula bacteriana. Na última etapa de reativação foram realizados os testes para produção de indol, atividade da urease, fermentação de glicose e sacarose e também os testes de catalase e de oxidase.

3.3 Caracterização Fenotípica

A caracterização fenotípica dos isolados ocorreu a partir dos resultados de testes bioquímicos que determinaram a subespécie e o biovar relacionados a cada um destes. A classificação dos isolados em um das três subespécies de *P. multocida* (*multocida*, *septica* e *gallicida*) foi realizada através da fermentação dos carboidratos dulcitol e sorbitol, de acordo com o método descrito por Mutters et al. (1985). A habilidade de fermentação dos carboidratos dulcitol, lactose, maltose, sorbitol, trehalose, xilose e de produção da enzima ornitina descarboxilase determina a classificação de cada uma das cepas em um dos 14 biovars estabelecidos (FEGAN et al., 1995; BLACKALL et al., 1997).

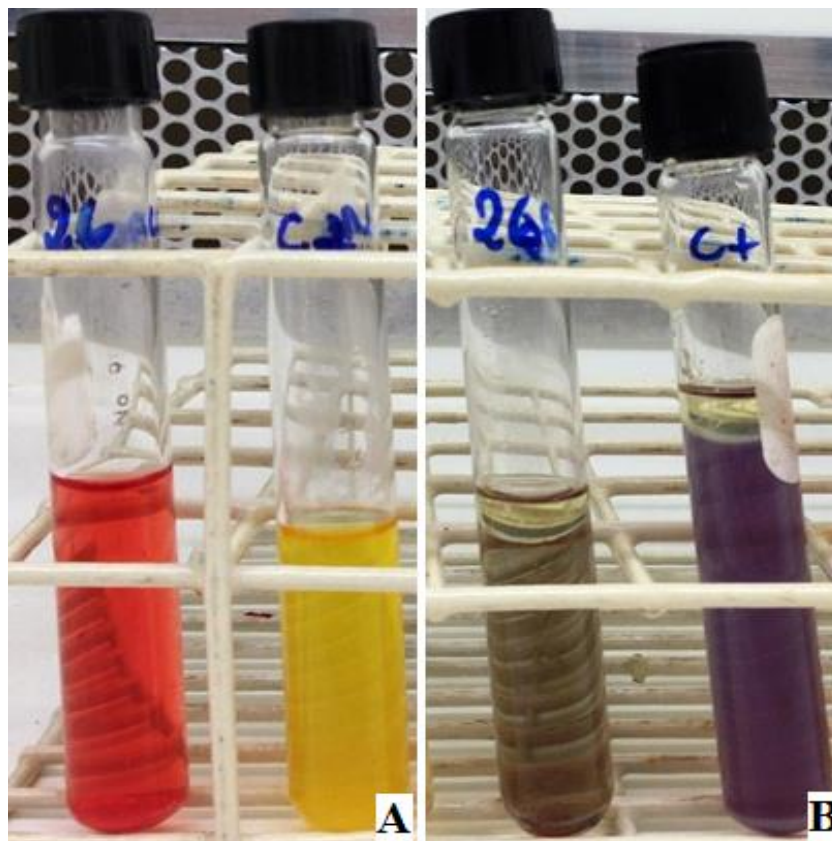
3.3.1 Preparo dos meios dos testes bioquímicos

Os açúcares e a ornitina foram preparados na concentração de 1%. Para realização do teste de descarboxilação, o aminoácido ornitina foi adicionado em tubos contendo caldo base para descarboxilação de Moeller. O caldo, juntamente com o aminoácido foi preparado de acordo com as indicações dos fabricantes (Synth®). Para realização dos testes de fermentação dos carboidratos, o caldo base foi previamente preparado de acordo com as instruções do fabricante (Merck®) e cada açúcar adicionado na concentração anteriormente citada.

3.3.2 Realização dos testes bioquímicos

Primeiramente, os 59 isolados foram divididos em quatro baterias de testes. A partir do ágar sangue, uma colônia característica para inoculação dos carboidratos e da ornitina foi escolhida. Os testes bioquímicos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante três dias e observados a cada 24 horas. A virada do indicador vermelho fenol, presente no preparo dos carboidratos, para cor amarela indica a fermentação do carboidrato e um pH do meio em torno de 6,8 (Figura 1). A inalteração da cor ou a coloração vermelho-rosada, a qual indica a alcalinidade do meio, foram considerados como resultados negativos.

Figura 1 - Testes Fenotípicos A: Teste de fermentação de carboidratos. B Teste de descarboxilação do aminoácido ornitina.



Para observação do aminoácido ornitina, a superfície do meio presente nos tubos de ensaio foi coberta assepticamente com óleo mineral de maneira que se formasse uma camada de 4 a 5mm após a inoculação da cepa. A virada do indicador púrpura de bromocresol da coloração amarela para a roxa indica a utilização do aminoácido e a alteração do pH do meio

para em torno de 6,8 (Figura 1). A elevação do pH ocorre devido ao acúmulo de amina, resultado da descarboxilação da proteína. A reação é promovida por uma enzima que cliva o grupo carboxil do aminoácido ornitina, resultando em uma molécula de amina e em dióxido de carbono.

As seguintes cepas padrão foram utilizadas como controles positivos dos testes realizados: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Pasteurella gallinarum* ATCC 13360 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Os resultados foram tabulados e comparados aos perfis bioquímicos descritos por Fegan et al. (1995) e Blackall et al. (1997) para cada um dos biovares apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características bioquímicas dos biovares de *Pasteurella multocida*.

| Fermentação | Biovares | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 13 | 14 |
| Ornitina | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Lactose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Maltose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Sorbitol | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + |
| Trehalose | - | + | - | + | - | - | + | - | + | + | - | - | - |
| Xilose | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + |

Fonte: Fegan et al.(1995); Blackall et al.(1997).

3.4 Pesquisa do Gene *ExbD-tonB* através de PCR

3.4.1 Extração do DNA

O DNA das amostras foi extraído através de tratamento térmico, segundo Ewers et al. (2006). Conforme a técnica, 1mL de BHI overnight de cada isolado foram aliquotados e mantidos congelados a -20°C por 10 min.. Após este período a soluções foram concentradas por centrifugação (12.000rpm por 2 min.), sendo o sobrenadante é desprezado e o pellet ressuspendido em 200µL de água ultra pura. O material foi mantido em banho-maria a 100°C por 10 min. e o sobrenadante repassado para outro eppendorf. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da análise por PCR.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente, os isolados foram classificados como *P. multocida* através de um protocolo de PCR espécie específico estabelecido por Bringhenti (2010), a partir da amplificação de um fragmento de 460pb do gene *kmt*. O protocolo de PCR utilizado no experimento para pesquisa do gene de virulência *exBD-tonB* foi o estabelecido por Furian et al. (2013) e a composição e a concentração dos reagentes do mix da reação constam na Tabela 2. Os primers ou iniciadores utilizados na amplificação de um fragmento do gene *exBD-tonB* foram sintetizados pela empresa Invitrogen® e as sequências selecionadas a partir do trabalho de Ewers et al. (2006).

Tabela 2 - Protocolo de PCR Composição e concentração dos componentes do mix.

| Componentes | Volume(μL) |
|---------------------------|------------|
| Água ultra pura | 17,65 |
| Tampão 10X | 2,5 |
| dNTPs (10mM) | 0,4 |
| Primer 1 (10pmol) | 0,5 |
| Primer 2 (10pmol) | 0,5 |
| Taq (1U) | 0,2 |
| MgCl ₂ (2,5mM) | 1,25 |
| DNA | 2 |
| Volume Total | 25 |

Fonte: Furian et al. (2013).

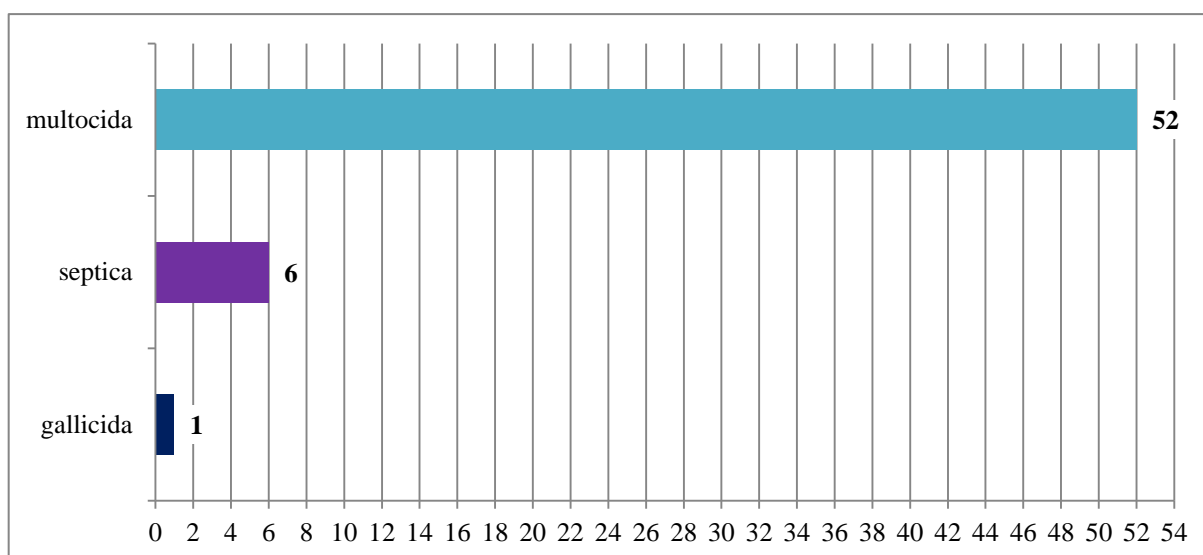
As condições da reação de amplificação utilizadas foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguida de 25 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 30 s., anelamento a 55°C por 30 s. e extensão a 72°C por 90 s., finalizando-se com a extensão final a 72°C por 10 min (FURIAN et al., 2013). As reações de amplificação do produto foram realizadas em termociclador (Swift MaxPro Thermal Cycler – ESCO Technologies®). A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, seguido de visualização em transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB MacroVue). Para cada reação foram utilizadas cepas de referência como controles positivos e negativos. As cepas *Pasteurella multocida* ATCC 15742 e *Pasteurella multocida* ATCC 12945 foram selecionadas como controles positivos da reação de PCR. Os controles negativos utilizados para o protocolo de PCR foram: *Reimerella anatipestier* ATCC 11845, *Mannheimia haemolytica* ATCC 29694, *Bordetella avium* ATCC 35086 e *Pasteurella gallinarum* ATCC 13360.

Todos os isolados foram previamente identificados como *P. multocida* através das características das colônias isoladas. Estas apresentaram reações positivas à oxidase e à catalase, fermentaram a glicose e a sacarose, produziram indol e foram urease negativas. Seis isolados apresentaram reação negativa no teste de indol, no entanto todas as amostras amplificaram o gene *kmt* através do teste de PCR.

4.1 Determinação da Subespécie

A determinação da subespécie foi baseada na habilidade das cepas em fermentarem sorbitol e dulcitol. A subespécie mais presente foi a *multocida*, a qual foi identificada em 56 dos 59 isolados testados. A distribuição dos isolados avaliados através de testes bioquímicos para determinação de subespécie de *P. multocida* encontra-se descrita na Figura 2.

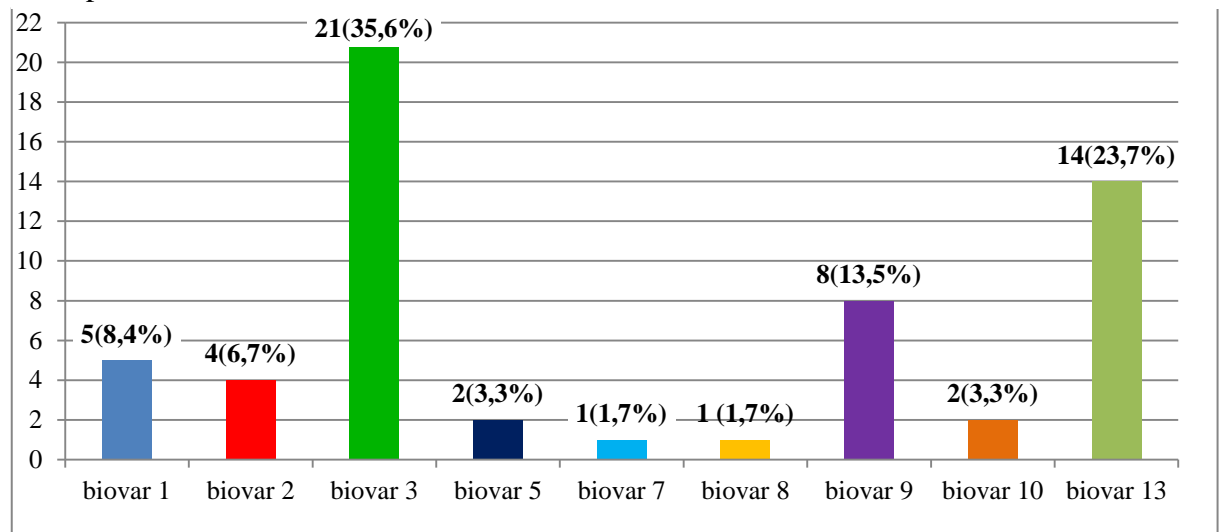
Figura 2 - Distribuição dos isolados de acordo com a subespécie a partir da fermentação dos açúcares sorbitol e dulcitol.



4.2 Determinação do Biovar

A distribuição dos 59 isolados de *P. multocida* conforme a classificação dos biovars encontra-se descrita na Figura 3. Os biovars 3, 13 e 9 com frequência de 35%, 23,3% e 13,3%, respectivamente, foram predominantes.

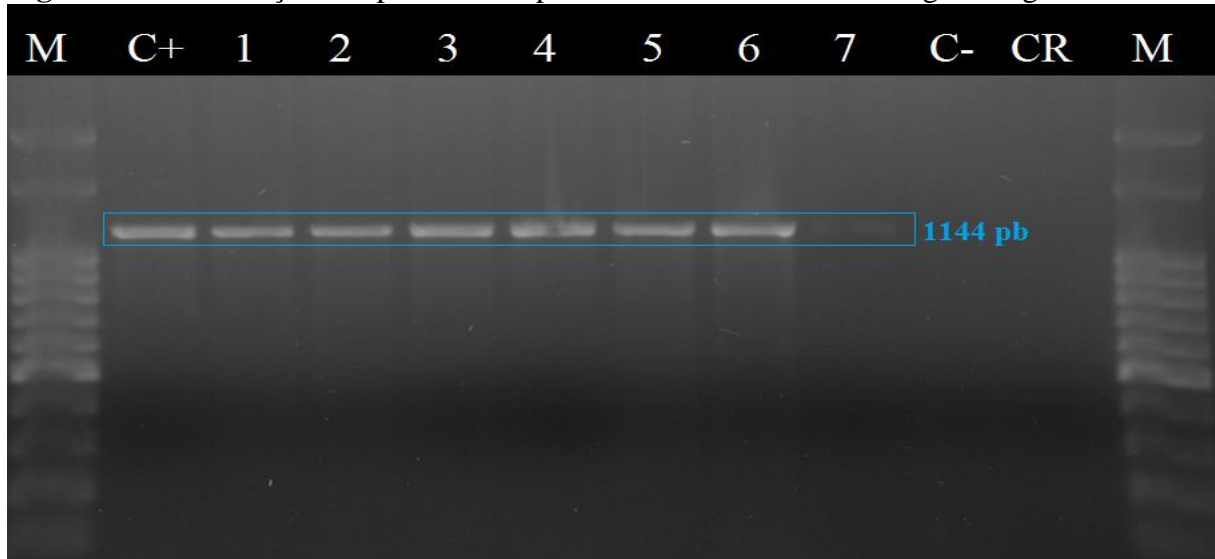
Figura 3 - Distribuição dos isolados de acordo com o biovar através da caracterização fenotípica



4.3 Pesquisa do Gene *exBD-tonB*

O gene *exBD-tonB* foi amplificado em 100% das cepas de *P. multocida* selecionadas para o trabalho (Figura 1).

Figura 4 - Visualização dos produtos amplificados em eletroforese em gel de agarose a 1%



M: marcador; C+: *P. multocida* ATCC 12945; 1 a 7: isolados; C-: *M. haemolítica* ATCC 29694; CR: controle da reação.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a subespécie de *P. multocida* com maior frequência foi a *multocida*, presente em 52 dos 59 isolados. Resultados similares foram obtidos em pesquisas realizadas na Argentina (LEOTTA et al., 2006), na Austrália (FEGAN et al., 1995; BLACKALL et al., 1997), na Hungria (VARGA et al., 2007), nos Estados Unidos (HIRSH et al., 1990) e na Espanha (GARCÍA et al., 2013). A subespécie *septica* esteve presente em cinco dos 59 isolados e a subespécie *gallicida* foi observada em apenas um isolado. A subespécie *gallicida*, está mais relacionada a casos de CA em aves aquáticas, como demonstra o trabalho desenvolvido por Hirsh et al. (1990) em que esta subespécie foi observada em 37% das 295 amostras pesquisadas. Da mesma forma, a subespécie *septica* é usualmente relacionada às cepas de *P. multocida* isoladas nos casos de mordidas de cachorro e arranhaduras de gatos provocadas em seres humanos (VARGA et al., 2007).

Os testes bioquímicos para determinação dos biovars mostraram que nove dos treze biovars estabelecidos por Fegan et al. (1995) e Blackall et al. (1997) foram observados neste estudo. Dentre os biovars, o de maior frequência foi o biovar 3, o qual pertence a subespécie *multocida*. Este biovar tem mostrado ser o mais comum, sendo sempre o de maior frequência em diversos animais nos mais variados países. Os outros biovars mais frequentes (biovar 13 e biovar 9) também estão relacionados à subespécie *multocida*. As cepas da subespécie *septica* pertencem aos biovars 5, 7 e 10. O biovar 10 difere do biovar 7 por ser uma variante maltose positiva e o biovar 5 é uma variante trehalose negativa. O único isolado da subespécie *gallicida* compete ao biovar 8, uma variante dulcitol negativa (FEGAN et al., 1995).

Apesar de todas as cepas terem sido confirmadas como *P. multocida* através da amplificação do gene *kmt* (460pb), a identificação de um isolado baseado somente nas suas características fenotípicas não foi possível, o mesmo ocorrendo em trabalhos anteriores (VARGA et al., 2007; STAHEL et al., 2009). Este resultado demonstra que a classificação, limitando-se as estirpes de *P. multocida* em poucos biovars, pode não ser adequada, pois ao longo do tempo surgem cepas com uma nova diferenciação na fermentação padrão e o sistema de classificação deve ser expandido com outros biovars (VARGA et al., 2007).

O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos (MAY et al 2000). Como é um elemento de transição, possui uma habilidade de troca de elétrons, assim possuindo um grande potencial de oxirredução. Conseqüentemente, esse elemento essencial é frequentemente usado como um co-fator em processos metabólicos, incluindo a síntese de

desoxirribonucleotídeo, fosforilação oxidativa e transporte de elétrons (FERGUSON; DEISENHOFER, 2002). Para obtenção desse elemento presente em baixa concentração no hospedeiro, a *P. multocida* desenvolveu várias estratégias para a aquisição de ferro. Mais de 2,5% do genoma desta bactéria é composto por genes que codificam proteínas homólogas a conhecidas proteínas envolvidas na aquisição ou absorção desse elemento (MAY et al., 2001).

O Complexo TonB é composto por três proteínas (ExbB, ExBD e TonB) responsáveis por fornecer energia ao sistema próton motor de captação de ferro. O gene *exBD-tonB* estava presente nas 59 cepas de *P. multocida*. Esse resultado para o gene foi o mesmo encontrado em outros trabalhos (EWERS et al 2006; FURIAN et al 2013). Como a energia gerada pelo complexo é requerida por diferentes mecanismos de captação de ferro (HATFALUDI et al., 2010), a frequência normalmente esperada para os genes que codificam essas proteínas é de 100% (BETHE et al, 2009).

6 CONCLUSÃO

A variabilidade da manifestação clínica na CA é possivelmente justificada pelo desequilíbrio da relação entre hospedeiro e bactéria, assim como pela presença de fatores de virulência e pela variação fenotípica das cepas que diferem os microrganismos patogênicos de uma mesma espécie. Os dados obtidos, em conjunto com trabalhos de inoculação experimental *in vivo*, serão utilizados em estudos futuros que buscam a classificação da patogenicidade dos isolados aviários de *P. multocida*. A alta frequência do gene *exBD-tonB* observada no estudo e em trabalhos anteriores (EWERS et al 2006; FURIAN et al 2013), sugere que este gene pode ser usado em protocolos de PCR que tenham o objetivo de identificação de amostras de *P. multocida* em casos suspeitos de CA.

REFERÊNCIAS

- BLACKALL, P. J.; PAHOFF, J.L.; BOWLES, R. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. **Veterinary Microbiology**, v.57, 1997. p.355-360
- BLACKALL, P. J.; MIFLIN, J. K.; MIFLIN, J. K. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: A review. **Avian Pathology**, v 29:4, 2000. p.271-287
- BETHE, A.; WIELER, L. H.; SELBITZ, H. J. & EWERS, C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, 2009. p. 97-105
- BOYCE, J.D.; HAPER, M.; WILKIE, I. W.; ADLER, B. *Pasteurella*. In:GYLES, C.L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C.O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 4. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 235-246
- CHRISTENSEN, H; BISGAARD, M. Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. **Avian Pathology**, v.26:3, 1997. p.462-483
- CHRISTENSEN, H; BISGAARD, M. Fowl cholera. **Revue Scientifique et Technique, International Office of Epizootics**, v.19, 2000. p.626-237
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. The genus *Pasteurella*. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3.ed. New York: Springer, 2006. p.1062-1090
- DZIVA, F.; MUHAIRWA, A.P.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Diagnostic and typing options for investigatin disease associated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v.128, 2008. p.1-22
- EWERS, C.; LÜBKE-BECKER, A.; BETHE, A.; KIEBLING, S.; FILTER, M.; WIELER, L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v.114, 2006. p.304-317
- FEGAN, N.; BLACKALL, P. J.; PAHOFF, J.L. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. **Veterinary Microbiology**, v.47, 1995. p. 281-286
- FERGUSON, A. D.; DEISENHOFER, J. TonB- dependent receptors – structural perspectives. **Biochimica et Biofphysica Acta**, v. 1565, 2002. p. 318-332
- FURIAN, T.Q.; BORGES, K.A.; ROCHA, S.L.S.; RODRIGUES, E.E., NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, 2013. p.177-182
- 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
- HARPER, M.; BOYCE, J. D.& ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS Microbiol Lett**, v.265. p. 1-10

HATFALUDI, T.; AL-HASANI, K.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 144, 2010. p. 1-17

HIRSH, D. C.; JESSUP, D. A.; SNIPES, K.P; CARPENTER, T. E.; HIRD, D. W.; McCAPES, R. C. Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from waterfowl and associated avian species in Califórnia. **J. Wildlife Dis**, v.26, 1990. p. 204-209.

KNÖBL, T. Pasteurelose (cólera aviária). In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. (Orgs.). **Patologia Aviária**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p.117-123

LEOTTA, G.A.; VIGO, G.B.; CHINEN, I.; PRIETO, M.; CALLEJO, R.; RIVAS, M. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.38, 2006. p.125-129

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

MAY, B. J.; ZHANG, Q.; LI, L. L.; PAUSTIAN, M. L.; WHITTAM, T. S.; KAPUR, V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm 70. **Proc. Acad. Sci.** v. 98, 2001. p. 3460-3465

MUTTERS, R.; IHM, P.; POHL, S.; FREDERIKSEN, W.; MANNHEIM, W. 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, 1985. p.309-322

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

PETERSEN, K. D.; CHRISTENSEN, J. P.; PERMIN, A.; BISGAARD, A. Virulence of *Pasteurella multocida* isolated from outbreaks of fowl cholera in wild birds for domestic poultry and game birds. **Avian Pathology**, v.30:1, 2001. p. 27-31

STAHEL, A.B.J.; HOOP, R.K.; KUHNERT, P.; KORCZAK, B.M. Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, 2009. p.793-802

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, 2007, p.425-434

VARGA, Z.; VOLOKHOV, D.V.; STIPKOVITS, L.; THUMA, A.; SELLYEI, B.; MAGYAR, T. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese. **Veterinary Microbiology**, v.163, 2013, p.149-156