

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

Comparação de três diferentes modelos animais para avaliação de patogenicidade de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves e suínos, e associação da patogenicidade a diferentes grupos moleculares

Tese de Doutorado

Roberta Marmitt Pilatti

Porto Alegre

2018

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

Comparação de três diferentes modelos animais para avaliação de patogenicidade de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves e suínos, e associação da patogenicidade a diferentes grupos moleculares

Autora: Roberta Marmitt Pilatti

Tese apresentada como requisito para a obtenção de grau como Doutor em Ciências Veterinárias na Área de Medicina Preventiva, especialidade em Sanidade Avícola.

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

Porto Alegre

2018

COMPARAÇÃO DE TRÊS DIFERENTES MODELOS ANIMAIS PARA AVALIAÇÃO DE
PATOGENICIDADE DE CEPAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLADAS DE AVES
E SUÍNOS, E ASSOCIAÇÃO DA PATOGENICIDADE A DIFERENTES GRUPOS
MOLECULARES

Banca Avaliadora:

Professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle (CDPA/UFRGS)

Dr. Thales Quedi Furian (CDPA/UFRGS)

Professor Dr. Luiz Cesar Bello Fallavena (ULBRA/RS)

Professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes (CDPA/UFRGS)

Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelo exemplo e pela sua presença constante nas horas boas e ruins.

A minha família, Inês, Adimir e Renata Pilatti, pelo apoio financeiro, moral, espiritual e pelo amor a mim sempre dedicado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, pelas palavras de apoio, orientação e compreensão durante a realização de todo este trabalho.

Ao professor Carlos Tadeu Pippi Salle, pela ajuda prestada na realização deste estudo.

Ao meu colega, amigo, e nesta oportunidade, avaliador da banca, Thales Quedi Furian, pela amizade, paciência, pelos ensinamentos, ajuda incondicional em todas as etapas de realização deste estudo.

Ao meu noivo, Ulisses Lopes, pelo apoio incondicional, paciência, pelas duras batalhas com as madrugadas insones, cansaço, convivência diária e por todos os difíceis momentos compartilhados.

Aos amigos e colegas do IPVDF e CDPA: Fabrine Finkler, Gabriel Luz, José Ávila, Suelle Vencatto, Karen Borges, Camila Almeida, Sílvio Rocha, Omar Pereira, Yuli Melisa, Gustavo Perdoncini, Daiane Carvalho, Aline Luisa de Oliveira, Diane Lima, Lucas Brunelli de Moraes e demais integrantes das equipes, pela ajuda prestada, pela amizade e pelos ensinamentos.

RESUMO

Apesar de ser uma bactéria que compõe a microbiota respiratória, sob algumas circunstâncias pode manifestar-se como um agente patogênico primário ou secundário, causando doença em aves e outros animais. Como agente primário, *P. multocida* leva a grandes perdas econômicas, causando cólera em aves, rinite atrófica em suínos e septicemia hemorrágica em bovinos e bubalinos. *P. multocida* é uma espécie heterogênea e a patogenicidade dos isolados pode ser amplamente variável. A suscetibilidade do hospedeiro a essas cepas varia consideravelmente entre espécies. Inoculações experimentais em camundongos e aves são comumente usadas para avaliar a patogenicidade de diferentes cepas, mas os resultados são geralmente subjetivos e pouco mensuráveis. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma nova metodologia para classificar a patogenicidade de cepas de *P. multocida*, através da formulação de um índice padrão. Para determinar esse índice, foram selecionadas 97 amostras de *P. multocida*, isoladas de cólera em aves e rinite em suínos. Cem microlitros de uma cultura bacteriana contendo 10^3 UFC/mL de cada isolado de *P. multocida*, foram inoculados pela cavidade córioalantoide, em 3 ovos embrionados. Além da mortalidade causada pela infecção, o tempo de morte e as lesões macroscópicas foram avaliados. Diferenças significativas foram observadas entre isolados de aves e suínos em relação aos índices de patogenicidade. O número de lesões e o percentual de bactérias recuperadas dos embriões inoculados também variaram de acordo com a origem do isolado. A partir dos índices observados, os isolados foram distribuídos em três classes de patogenicidade: alta, média e baixa. A avaliação dos diferentes índices de patogenicidade, estudados neste trabalho, permitem o estabelecimento de novos modelos de avaliação de patogenicidade de isolados de *P. multocida* e podem ser uma alternativa aos modelos subjetivos até então utilizados. A comparação dos índices de patogenicidade obtidos nos diferentes modelos analisados nos permite afirmar que a variação esperada para os diferentes modelos não pode ser observada. A análise dos diferentes perfis genéticos obtidos para as cepas de origem aviária, a partir da clivagem do gene *ompH* e da técnica de PCR-RFLP também não revelou diferença estatística entre os perfis obtidos e suas respectivas patogenicidades obtidas no modelo experimental de camundongos.

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

ABSTRACT

*Although it is a bacterium that makes up the respiratory microbiota, under some circumstances it may manifest itself as a primary or secondary pathogen, causing disease in birds and other animals. As a primary agent, *P. multocida* leads to severe economic losses, causing cholera in birds, atrophic rhinitis in pigs and hemorrhagic septicemia in cattle and buffaloes. *P. multocida* is a heterogeneous species and the pathogenicity of the isolates can be widely variable. The susceptibility of the host to these strains varies considerably between species. Experimental inoculations in mice and birds are commonly used to evaluate the pathogenicity of different strains, but the results are generally subjective and poorly measurable. The objective of this work was to establish a new methodology to classify the pathogenicity of *P. multocida* strains by formulating a standard index. To determine this index, 97 samples of *P. multocida*, isolated from cholera in birds and rhinitis in swine, were selected. One hundred microliters of a bacterial culture containing 10^3 CFU / mL of each *P. multocida* isolate were inoculated by the chorioallantoic cavity in 3 embryonated eggs. In addition to infection mortality, time of death and macroscopic lesions were assessed. Significant differences were observed between isolates of birds and pigs in relation to pathogenicity indexes. The number of lesions and the percentage of bacteria recovered from the inoculated embryos also varied according to the origin of the isolate. From the observed indices, the isolates were distributed in three pathogenicity classes: high, medium and low. The evaluation of the different pathogenicity indexes, studied in this work, allows the establishment of new pathogenicity evaluation models of *P. multocida* isolates and may be an alternative to the subjective models previously used. The comparison of the pathogenicity indices obtained in the different models analyzed allows us to state that the variation expected for the different models can not be observed. The analysis of the different genetic profiles obtained for the strains of avian origin, from the cleavage of the *ompH* gene and the PCR-RFLP technique also did not reveal statistical difference between the profiles obtained and their respective pathogenicities obtained in the experimental model of mice.*

Key words: Pasteurella multocida, pathogenicity index, embryonated eggs, mice, chicks.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escores atribuídos aos tempos de morte de acordo com FBS correspondente ao tempo transcorrido p.i. e às lesões macroscópicas observadas nos embriões.....	38
Tabela 2 -	Apresentação das diluições ideais e concentrações bacterianas para cada uma das três amostras de <i>Pasteurella multocida</i> utilizadas.....	41
Tabela 3 -	Distribuição da frequência de mortalidade dos embriões inoculados de acordo com o tempo transcorrido (hs) pós inoculação, para as diferentes origens das amostras de <i>Pasteurella multocida</i>	43
Tabela 4 -	Comparação da frequência absoluta das lesões avaliadas e do reisolamento das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> diagnóstico das lesões e reisolamento bacteriano nos grupos de embriões inoculados, de acordo com a origem das amostras.....	44
Tabela 5 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a origem das amostras de <i>Pasteurella multocida</i>	44
Tabela 6 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a distribuição das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária e suína nos grupos de patogenicidade.....	45
Tabela 7 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a distribuição das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> origem aviária nos grupos de patogenicidade.....	46
Tabela 8 -	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a distribuição das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem suína nos grupos de patogenicidade.....	46

Tabela 9 -	Comparação entre as medianas obtidas para as amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem avícola nos três diferentes modelos animais.....	47
Tabela 10 -	Comparação entre as medianas obtidas para as amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem de suínos nos três diferentes modelos animais.....	48
Tabela 11 -	Relação entre o modelo experimental, origem da amostra, percentual de lesões encontradas e percentual de reisolamento da bactéria.....	49
Tabela 12 -	Comparação da mediana dos índices de patogenicidade obtidos em camundongos para os diferentes perfis genéticos das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária.....	50
Tabela 13 -	Comparação dos índices de patogenicidade obtidos em camundongos, para as 56 amostras de origem aviária de <i>Pasteurella multocida</i> , de acordo com a classificação nos diferentes sorogrupos.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ovos mantidos na incubadora e avaliação da viabilidade embrionária por ovoscopia.....	35
Figura 2 - Técnica de inoculação via cavidade córioalantóide, utilizada nos ovos embrionados.....	36
Figura 3 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) através da técnica da gota.....	36
Figura 4 - Lesões macroscópicas observadas durante a necropsia dos embriões inoculados com as cepas de <i>Pasteurella multocida</i>	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Distribuição da mortalidade embrionária durante o período de avaliação em função do tempo transcorrido pós inoculação..... 42
- Gráfico 2** - Distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* de acordo com a origem nos grupos de patogenicidade..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AD	Ágar Amido Dextrose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Ágar Sangue
BHI	<i>Brain- Heart Infusion</i>
CA	Cólera Aviária
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFI	Congestão no Folículo da Pena
CH	Congestão Hepática
DL ₅₀	Dose Letal para matar 50% dos animais
DP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EH	Embrião Hemorrágico
FBS	Fator de Bonificação de Sobrevivência
GAG's	Glicosaminoglicanos
IP	Índice de Patogenicidade
IPI	Índice de Patogenicidade Individual
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LPS	Lipopolissacarídeos
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MTM	Média do Tempo de Morte
N°/ n	Número
OIE	Organização dos Estados Internacionais
OMP	<i>Outer Membrane Proteins</i>
Pi/ p.i.	Pós inoculação
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>

pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppb	Partes por bilhão
RA	Rinite Atrófica
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SARP	Soroaglutinação Rápida em Placa
SIF	Sistema de Inspeção Federal
SH	Septicemia Hemorrágica
TM	Tempo de Morte
TSA	Ágar <i>Trip-case</i> de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Família <i>Pasteurellaceae</i>	18
2.2	Características morfológicas e bioquímicas	18
2.3	<i>Pasteurella multocida</i> em aves	20
2.4	Patogenia	21
2.4.1	Sinais de infecção aguda.....	22
2.4.2	Sinais de infecção crônica.....	23
2.4.3	Lesões macroscópicas.....	23
2.5	Fatores de virulência	23
2.5.1	Cápsula.....	24
2.5.2	Lipopolissacarídeos (LPS).....	25
2.5.3	Fímbrias, adesinas e proteínas de membrana externa (OMPs).....	25
2.6	Métodos de diagnóstico e de estudos de patogenicidade	26
2.7	Métodos de tipificação molecular dos isolados	30
2.8	Estrutura da Tese	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Comitê de Ética no Uso de Animais	33
3.2	Locais de estudo	33
3.3	Amostras	33
3.4	Inoculação de Ovos Embrionados SPF e Determinação dos Índices de Patogenicidade	34
3.4.1	Aquisição e manutenção de ovos embrionados SPF.....	34
3.4.2	Dose Letal 50%.....	35
3.4.3	Preparo do inóculo.....	35
3.4.4	Cálculos dos Índices de Patogenicidade.....	37
3.5	Comparação dos índices de patogenicidade obtidos em diferentes modelos animais	39
3.6	Associação dos perfis moleculares obtidos através de PCR-RFLP e dos sorogrupos A e D de <i>Pasteurella multocida</i> com índices de patogenicidade obtidos através da inoculação em camundongos...	40

3.7	Análise estatística	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Dose Letal 50%	41
4.2	Relação da mortalidade com o tempo de morte avaliado	41
4.3	Presença de lesões e reisolamento bacteriano	43
4.4	Índices de Patogenicidade	44
4.5	Comparação dos Índices de Patogenicidade estabelecidos para <i>Pasteurella multocida</i> nos modelos animais: pintos de um dia, camundongos e ovos embrionados	47
4.6	Associação dos perfis moleculares obtidos através de PCR-RFLP e dos sorogrupos A e D de <i>Pasteurella multocida</i> com índices de patogenicidade obtidos através da inoculação em camundongos...	49
5	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A	Distribuição das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária e seus respectivos índices de patogenicidade em Pintos de um dia (Pintos), Camundongos (Cam) e Ovos Embrionados (OE).....	62
APÊNDICE B	Distribuição das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem suína e seus respectivos índices de patogenicidade em Pintos de um dia (Pintos), Camundongos (Cam) e Ovos Embrionados (OE).....	63
APÊNDICE C	Exemplo de cálculo de Índice de Patogenicidade individual e do índice de patogenicidade da amostra.....	64
ANEXO A	Protocolo de aprovação do CEUA/IPVDF.....	65
ANEXO B	<i>Establishment of a Pathogenicity Index for One-day old Broilers to Pasteurella multocida Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine</i>	66
ANEXO C	<i>Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of Pasteurella multocida</i>	72
ANEXO D	<i>Evaluation of the biofilm formation capacity of Pasteurella multocida strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity</i>	79

ANEXO E	<i>Identification of the Capsule Type of Pasteurella multocida isolates from Cases of Fowl Cholera by multiplex PCR and Comparison with Phenotypic Methods.....</i>	87
---------	---	----

1 INTRODUÇÃO

No último ano, as fontes de proteína animal brasileira, dentro de um contexto mundial, precisaram se requalificar perante os grandes importadores. O posicionamento da Polícia Federal Brasileira sobre uma investigação em andamento, que se referia a qualidade do processamento e fiscalização dos produtos frigoríficos, acabou desencadeando um cenário de desconfiança mundial sobre a idoneidade dos produtos produzidos no Brasil (REVISTA POLÍTICA AGRÍCOLA, 2017).

As consequências destas investigações e do escândalo decorrente levaram a uma queda de 6,6% nas exportações no primeiro quadrimestre de 2017, e mesmo após os devidos esclarecimentos realizados pelos órgãos governamentais e com o envolvimento do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para reiterar a certificação das plantas frigoríficas brasileiras para a exportação, fechamos o ano de 2017 com 1,5% a menos de embarques de carnes de frango, quando comparados ao ano de 2016 (AVISITE, 2018).

Tendo exportado um volume total de 4,234 milhões de toneladas de carne de frango em 2017, nosso país continua configurando-se como o um dos maiores produtores e exportadores deste tipo de carne, embora este volume tenha se apresentando inferior ao ano de 2016, quando o volume total de proteína de frango passou dos 4,309 milhões de toneladas (ABPA, 2017; AVISITE, 2018).

Em tempos de crise, a carne de frango torna-se a opção mais acessível aos brasileiros, fazendo com que o consumo *per capita* tenha tendência a subir. Porém, os dados divulgados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) em 2017, demonstram uma redução de 2,15 Kg/habitante/ano no consumo de carnes de aves no ano de 2016 em relação ao ano de 2015 (ABPA, 2017).

Oferecer alimentos seguros e saudáveis para o consumo, com baixo custo e garantindo a sustentabilidade do sistema produtivo são nossas missões. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), em conjunto com os órgãos estaduais, realiza auditorias, vistorias e as mais diversas análises visando garantir a qualidade e inocuidade dos alimentos brasileiros.

Fomentar a qualidade sanitária através da certificação das propriedades produtoras de alimentos, de frequentes monitorizações dos plantéis, garantindo que estes estejam sob altos níveis de biossegurança, é subsidiar com agilidade e assertividade o estabelecimento de

protocolos de gerenciamento de patógenos para, em caso de problemas sanitários, proporcionar um diagnóstico célere para a contenção de possíveis problemas sanitários.

A produção de aves proporciona com frequência desafios de caráter infectocontagiosos, que na maioria das vezes refletem-se não só em problemas sanitários nos plantéis acometidos, mas também em problemas produtivos. Quando enfrenta-se estes desafios, a tomada de decisão imprecisa frente a determinada enfermidade pode ter impacto desastroso, dependendo do potencial de disseminação.

Ainda que haja poucos estudos sobre o impacto na avicultura brasileira, a Cólera Aviária (CA) ou Pasteurelose, caracterizada por ser uma doença septicêmica que pode acometer tanto aves selvagens quanto as domésticas, destaca-se como uma das principais causas de perdas econômicas em todo o mundo.

Pasteurella multocida, agente causador da CA, é um habitante comensal do trato respiratório e digestivo de animais saudáveis. É comum que esta bactéria atue como agente secundário a outras enfermidades, tendo em vista que fatores de estresse e doenças concomitantes podem diminuir a resistência dos animais e facilitar a multiplicação da *P. multocida*, resultando em um processo infeccioso no hospedeiro. É o agente causador de numerosas doenças de relevância econômica, como a pneumonia enzoótica em bovinos e ovinos, a septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos, a rinite atrófica em suínos, a pasteurelose em coelhos e a cólera aviária.

Patologias causadas por *P. multocida* certamente impõem um enorme ônus econômico à atividade pecuária, estimulando o desenvolvimento de pesquisas para um maior esclarecimento dos mecanismos pelos quais esta bactéria é capaz de causar doenças. Paralelamente, trabalhos que avaliam um acesso rápido a diagnósticos complementares ou para substituir métodos tradicionais também são importantes.

O diagnóstico confirmatório da doença e a detecção de *P. multocida* dependem do isolamento e da identificação do organismo suspeito. A utilização de modelos animais para a confirmação do diagnóstico é usual. Um dos modelos mais utilizados com a finalidade de diagnosticar *P. multocida* é o camundongo.

Devido aos altos custos de manutenção, à necessidade de treinamento para a manipulação dos animais, além da questão do bem-estar animal, as avaliações macroscópicas dos indicadores de patogenicidade costumam ser muito subjetivas neste modelo.

Durante os últimos anos, o Centro de Diagnóstico em Patologia Aviária (CDPA) desenvolveu diversos estudos sobre caracterização genética, sorológica, bioquímica e capacidade patogênica de uma série de amostras de *Pasteurella multocida* (FURIAN et al.,

2013; FURIAN et al., 2014; FURIAN et al., 2016a; FURIAN et al., 2016b; PILATTI et al., 2016; EMMERY et al., 2017). Estudos similares a estes foram desenvolvido por Souza et al. (2016) utilizando amostras bacterianas de *Escherichia coli* e por Lima et al. (2016) com amostras de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*.

Estes trabalhos realizados têm como finalidade fomentar o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico preditivo que buscam não mais utilizar modelos animais no diagnóstico microbiológico, podendo nortear, a partir do perfil genético destas cepas de *Pasteurella multocida*, a patogenicidade esperada ou a resistência a antimicrobianos, acelerando o processo de diagnóstico e a tomada de decisão para uma intervenção medicamentosa correta, quando houver um quadro clínico suspeito.

O presente trabalho tem como objetivo o estabelecimento de um índice de patogenicidade de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de aves e suínos em ovos embrionados, comparar os índices de patogenicidade já obtidos em outros modelos experimentais analisando a ocorrência de lesões e suas taxas de reisolamento bacteriano e, além disto, realizar a análise das amostras provenientes de aves e seus IP obtidos no modelo experimental de camundongos, de acordo com perfis biomoleculares e sorogrupos aos quais pertencem.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família *Pasteurellaceae*

A família *Pasteurellaceae* atualmente é constituída por dez gêneros, destacando-se entre eles: *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Actinobacillus* e *Avibacterium*; sendo composta por aproximadamente 57 espécies (NASCIMENTO et al., 2009; KORZAC et al., 2004). No passado, a bactéria *P. multocida* apresentou várias denominações distintas, porém a denominação *Pasteurella multocida* foi proposta por Rosenbusch e Merchant em 1939, e é aceita como o nome oficial no *Manual Bergey's* (WHITMANN et al., 1957).

O gênero *Pasteurella* foi assim designado para homenagear Louis Pasteur, que em meados de 1880 foi o primeiro pesquisador a reconhecer a bactéria como agente causador de uma doença fatal em galinhas. Além disto, Pasteur também demonstrou em seus estudos que cepas atenuadas de *P. multocida* poderiam ser utilizadas como vacinas vivas para estimular a imunidade contra a doença (BOYCE et al., 2010).

O gênero *Pasteurella* apresenta constantes reclassificações taxonômicas (MUTTERS et al., 2003; CHRISTENSEN E BISGARD, 2006; CHRISTENSEN et al., 2005 apud DZIVA, 2008). Atualmente, o gênero *multocida* é subdividido em três subespécies: *multocida*, *gallicida* e *septica*, classificadas com base na produção de ácido a partir da fermentação dos açúcares D-dulcitol e D-sorbitol (MUTTERS et al., 1985 apud CHRISTENSEN, 2006).

Bactérias da família *Pasteurellaceae* são geralmente isoladas de membranas mucosas de aves e mamíferos, incluindo-se seres humanos. Embora a maioria das espécies seja comensal, alguns destes microrganismos podem ser encontrados atuando como patógenos (MARIO e MIKAEL, 2002). Membros destas espécies estão distribuídos mundialmente, entre mamíferos e aves (RHOADES e RIMLER, 1991).

Sendo um grupo de bactérias bem diversificado, diferentes genótipos podem implicar em doenças diferentes, podendo-se dizer que estes grupos genotípicos podem paralelamente estar associados a hospedeiros preferenciais (AMONSIN et al., 2002). Estudos recentes desenvolvidos com hibridização, demonstram a existência de uma proximidade filogenética entre algumas espécies da família *Pasteurellaceae* com espécies das famílias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae* (DE LEY et al., 1990).

2.2 Características morfológicas e bioquímicas

As técnicas tradicionais de microbiologia fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem e identificação dos gêneros, espécies e subespécies

microbianas (GANDRA et al., 2008). A classificação dos gêneros da família *Pasteurellaceae*, historicamente, é creditada também a classificação de suas características fenotípicas, como por exemplo, à utilização do grupo Heme e/ou de Adenosina Nicotinamida Dinucleotídeo (NAD), e por sua capacidade de invasão de células de vertebrados (MACINNES e BORR, 1990).

Pasteurella spp é uma bactéria Gram negativa, com característica bipolar que pode ser observada ao microscópio óptico após as colorações de Giemsa ou Wright, especialmente em tecidos. Não forma endósporos, é imóvel e geralmente se apresenta em formato de cocobacilo ou em células arredondadas que ocorrem sozinhas, em pares ou, menos frequentemente, em curtas cadeias, dependendo do estágio de crescimento (BACK, 2004; DZIVA et al., 2008; CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006; NASCIMENTO et al., 2009; BOYCE et al., 2010).

O isolamento primário de *P. multocida* pode ser dificultado pela competição com microrganismos da microflora do hospedeiro e os meios de cultura seletivos não apresentam amplas aplicações para esta bactéria (DZIVA et al., 2008). Por outro lado, a inoculação do material suspeito em camundongos e a subsequente coleta de órgãos como baço, fígado, coração, pulmões e sangue cardíaco aumentam a probabilidade de isolamento de *P. multocida* (DZIVA et al., 2004; MOHAMED et al., 2012).

Para o isolamento padrão, ágar sangue (AS) suplementado com 5% de sangue ovino ou bovino ou ágar chocolate podem ser utilizados. Em adição ao AS, ágar amido dextrose (AD) e ágar *tripcase* de soja (TSA - *trypticase soy agar*) também são recomendados para o isolamento primário (CHRISTENSEN e BISGAARD, 2000 *apud* CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006).

As bactérias do gênero *Pasteurella* crescem sob condições aeróbicas, microaerófilas, ou anaeróbicas em temperaturas entre 37°C e 41°C, em pH nas faixas de 7,2 a 7,8. A maioria das espécies do gênero são oxidase e catalase positivas e podem fermentar a glicose e outros açúcares com a produção de ácido, mas sem a presença de gás (PETER et al, 2005; GLISSON et al., 2008a; BOYCE et al., 2010).

As colônias de *P. multocida* em ágar sangue costumam ter características comuns, sendo elas: cor acinzentada, não-hemolíticas, mucoides ou não-mucoides e apresentam um típico cheiro adocicado de indol. As colônias são circulares, levemente elevadas e regulares com uma margem inteira. A sua superfície é geralmente lisa, brilhante e não-transparente (WOO et al., 2006; DZIVA et al., 2008; CHRISTENSEN e BISGAARD, 2008; GLISSON et al., 2008b). Todavia, maiores variações na morfologia das colônias têm sido observadas e algumas são relacionadas com o hospedeiro. Por exemplo, colônias mucoides geralmente são obtidas de lesões de pneumonia em bovinos, suínos e coelhos, enquanto as colônias não-mucoides são comumente observadas quando isoladas de aves. As colônias de *P. multocida* não apresentam

β -hemólise e possuem diâmetro de 0,5 a 2 mm após 24 horas de incubação à 37°C (CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006; DZIVA et al, 2008). O crescimento em caldo usualmente causa turbidez, mas crescimento granular também pode ocorrer (MUTTERS et al., 2003).

A maioria das amostras de *P. multocida* apresenta um polissacarídeo capsular. A antigenicidade da cápsula pode ser utilizada para identificar cinco sorogrupos A, B, D, E e F. A predileção da doença pelo hospedeiro é geralmente relatada ao sorogrupo, como exemplo as cepas envolvidas em casos de septicemia hemorrágica pertencem aos sorogrupos B ou E, por outro lado, os isolados de cólera aviária pertencem ao grupo A (MUTTERS et al., 2003; BOYCE et al., 2000; CHUNG et al., 2001; TABATABEI, et al., 2002; BACK, 2004, HARPER et al., 2006, EWERS et al., 2006).

Em 1952, Carter desenvolveu o primeiro teste sorológico de hemoaglutinação passiva baseado na identificação dos antígenos capsulares e dos cinco sorogrupos (A, B, D, E e F) (CARTER, 1955; GLISSON, 2008b; NASCIMENTO et al., 2009; BOYCE et al., 2010). O segundo método sorológico foi desenvolvido por Heddleston em 1972. É um teste de imunoprecipitação por gel difusão que classifica as cepas em 16 diferentes sorotipos, estes baseados na presença dos antígenos do lipopolissacarídeo (LPS) (HEDDLESTON et al., 1972; NASCIMENTO et al., 2009; BOYCE et al., 2010).

O sistema padrão de sorotipificação para *P. multocida* engloba ambos os testes sorológicos (Carter e Heddleston), sendo que na sua nomenclatura de classificação o sorotipo capsular consta primeiro, seguido pela identificação dos antígenos somáticos (ex: A:1 – sorogrupo capsular A, e sorotipo LPS tipo 1) (BOYCE et al., 2010). Embora o diagnóstico bacteriológico confirme o isolamento de *P. multocida*, a sua presença não pode ser associada com a doença sem a observação de sinais clínicos e ou de lesões macroscópicas, pois a bactéria é comensal do trato respiratório superior das aves e dos mamíferos (SONGSERN et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2009).

2.3 *Pasteurella multocida* em aves

As bactérias pertencentes ao gênero *Pasteurella* podem ser agentes primários ou patógenos oportunistas quando associados a outras doenças. *P. multocida* é uma espécie comumente associada com doenças de importância econômica para animais de produção, causando Cólera Aviária (CA) nas aves, Septicemia Hemorrágica (SH) em bovinos e búfalos, Rinite Atrófica (RA) em suínos e Pasteurelose em coelhos (DZIVA et al., 2008; BOYCE et al, 2010; HUBERMAN et al., 2011).

Cólera aviária é uma doença bacteriana septicêmica das aves e uma das primeiras enfermidades avícolas reportadas, caracterizada por alta mortalidade (CHAR et al. 1982 apud SOOD e VERMA, 2006; RAMADEVI et al., 2000 *apud* SOOD e VERMA, 2006). Geralmente é considerada uma infecção envolvida com a via respiratória, afetando severamente pulmões e sacos aéreos em casos de septicemia terminal da doença (RHOADES e RIMLER, 1991). Algumas evidências indicam que o trato alimentar pode ser severamente afetado em aves silvestres e patos domésticos, embora o envolvimento da via oral como uma porta de entrada para o agente ainda não tenha sido determinado (SOOD et al., 2006). Todavia, a CA apresenta unicamente transmissão por via horizontal. Embora a septicemia seja geralmente observada no estágio final da CA, é comum que o sangue seja o primeiro local de multiplicação, seguido de pulmões, fígado e baço (BOYCE et al., 2006).

Normalmente, a CA é mais prevalente no final do verão e durante o inverno. As aves mais frequentemente afetadas são galinhas, perus, patos e gansos, mas aves silvestres e outros pássaros domésticos também são susceptíveis (GLISSON, 2008b). Segundo Nascimento et al. (2009), há uma maior susceptibilidade em perus do que em galinhas, e dentre estas espécies, aves adultas entre 16 e 40 semanas de vida são mais afetadas que aves jovens.

Aves carreadoras provenientes de outros locais, assim como mamíferos, podem transmitir o agente. As cepas envolvidas nesta transmissão apresentam variação quanto ao grau de virulência, dependendo da espécie de isolamento. Por exemplo, cepas isoladas de suínos costumam ser altamente virulentas para as aves (GLISSON, 2008b).

A disseminação de *P. multocida* entre os lotes está primariamente envolvida com excreções orais, nasais e conjuntivais de aves doentes que contaminam o meio ambiente, principalmente ração e água (GLISSON, 2008b). Carreadores saudáveis ou infecções latentes são comuns e desempenham um importante papel na epidemiologia da doença (DZIVA, et al., 2008). Em casos clínicos agudos, a mortalidade das galinhas é de até 20%, sendo que perdas maiores podem ser relatadas. Redução na produção de ovos e persistência de infecção localizada frequentemente ocorrem (GLISSON, 2008b).

2.4 Patogenia

Muitas bactérias vivem em sincronismo com seus hospedeiros e, em algumas vezes, podem se beneficiar desta relação. Por exemplo, bactérias comensais podem tornar-se patogênicas após uma alteração no *status* sanitário do hospedeiro ou após variações nas características do próprio microrganismo, devido à transferência de genes de virulência (KUBATZKY, 2012).

A maioria das cepas comensais de *P. multocida* é relativamente inócua para hospedeiros imunocompetentes. Entretanto, alguns isolados têm o potencial para causar sérias doenças com infecções multissistêmicas. (CAMERON et al., 1996).

Aparentemente, animais saudáveis podem manter populações de *P. multocida* na mucosa da orofaringe por longos períodos, mas os mecanismos precisos pelos quais a bactéria consegue invadir e colonizar os pulmões ou outros tecidos não é conhecido (DE ALWIS, et al., 1990 apud BOYCE, et al., 2010; MUHAIRWA et al., 2000). Normalmente, a bactéria não ultrapassa o epitélio ou a mucosa do trato gastrointestinal de aves, mas prontamente coloniza o trato respiratório inferior se inoculada na traqueia (WILKIE et al., 2000 apud BOYCE, et al., 2010).

Em mamíferos, a colonização do tecido pulmonar geralmente requer fatores predisponentes, como infecções virais ou uma infecção por *Mycoplasma* spp. O estresse pode causar alterações em animais previamente saudáveis, situação que precede a invasão e a infecção sistêmica (BOYCE et al., 2010).

A doença ocorre devido a rápida invasão do hospedeiro, com o agente multiplicando-se em diferentes tecidos, até que ocorra uma septicemia. A virulência das cepas que causam a CA está relacionada à habilidade da bactéria em resistir à fagocitose no interior dos tecidos. Quando o microrganismo atinge um grande número, é provável que ocorra autólise e endotoxinas sejam liberadas em quantidade suficiente para causarem lesões aos tecidos do hospedeiro (NASCIMENTO et al., 2009). A doença usualmente ocorre em duas formas, uma septicêmica e aguda, com altas taxas de morbidade e de mortalidade e outra crônica caracterizada por uma infecção localizada das articulações e dos seios nasais (RHOADES e RIMLER, 1991 apud AMONSIN, 2002).

2.4.1 Sinais de infecção aguda

Os sinais clínicos nos casos agudos são frequentemente observados somente algumas horas antes da morte (GLISSON, 2008b). Os sinais podem evoluir tão rapidamente que as aves morrem sem apresentar sintomas. Taxas de mortalidade entre 80 e 90% podem ocorrer se não houver tratamento (NASCIMENTO et al., 2009). Nos casos agudos em perus é comum observar pneumonia com acúmulo de exsudato fibrino-caseoso no pulmão (BACK, 2004; GLISSON, 2008b; NASCIMENTO et al., 2009).

Os sinais clínicos que ocorrem frequentemente são febre, anorexia, penas arrepiadas, descarga oral, diarreia inicialmente esbranquiçada e posteriormente aquosa e/ou verde mucoide, além do aumento da taxa respiratória e cianose de crista e barbelas nos períodos próximos à

morte (BACK, 2004; GLISSON, 2008b; NASCIMENTO et al., 2009). Aves que sobrevivem ao estágio inicial da septicemia aguda podem sucumbir aos efeitos debilitantes da doença ou se recuperarem e se tornarem hospedeiras cronicamente infectadas (GLISSON, 2008b).

2.4.2 Sinais de infecção crônica

Aves com infecções crônicas tendem a apresentar sinais clínicos e lesões edematosas ou inflamatórias associadas com o local de infecção, sendo a barbela, os seios nasais, as articulações dos membros inferiores e asas as regiões mais comuns (BACK, 2004). Algumas lesões crônicas podem envolver o ouvido médio e ossos craniais, determinando a ocorrência de torcicolo (GLISSON et al., 2008b). Abscessos com acúmulo de material caseoso podem estar presentes nos seios infraorbitários e nos espaços ósseos da calota craniana (BACK, 2004; GLISSON, 2008b).

2.4.3 Lesões macroscópicas

A presença e a intensidade das lesões variam de acordo com a severidade do surto. Em caso de septicemia aguda, as lesões podem estar ausentes, mas de modo geral observa-se hiperemia, congestão generalizada e a presença de petéquias e também de hemorragias no coração, da gordura abdominal, da moela, do intestino e do pulmão. O fígado geralmente apresenta edema, congestão e focos puntiformes de necrose. Nas poedeiras e nas matrizes, pode ocorrer oviposição intrabdominal, ooforite, atresia dos folículos ovarianos, hiperemia dos folículos imaturos e estroma ovárico (BACK, 2004; GLISSON, 2008b; NASCIMENTO et al., 2009). Nos casos crônicos, lesões inflamatórias podem estar localizadas ou relacionadas com artrite, peritonite, salpingite, edema facial, acúmulo de exsudato caseoso no ouvido médio, no saco conjuntival e na barbela. Lesões crônicas dos ossos da cabeça e do ouvido médio têm sido reportadas como causadoras de torcicolo (BACK, 2004; GLISSON, 2008b; NASCIMENTO et al., 2009).

Muitas lesões também são relatadas como distúrbios vasculares, como hiperemia dos vasos das vísceras abdominais, hemorragias petequiais e equimóticas no epicárdio e serosas. Aumento nos volumes de líquidos peritoneais e pericárdicos também são frequentemente relatados (AKHTAR, 2013).

2.5 Fatores de virulência

As bactérias, através da evolução, desenvolveram diferentes estratégias para evadirem-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A palavra patogenicidade descreve a gama de

todas as características de um microrganismo que desenvolvem um papel na infecção. As primeiras definições de virulência derivam de antigos estudos de clássicos patógenos bacterianos a partir do emprego dos Postulados de Koch (BOERLIN, 2010). O termo virulência descreve o grau de patogenicidade de um microrganismo específico (KUBATZKY, 2012).

Bactérias causam doenças através de uma variedade de mecanismos de virulência em um processo altamente complexo que envolve a invasão do hospedeiro, barreiras de proteção, evasão do sistema imune, multiplicação, danos e escape para continuidade do ciclo infeccioso. Os dois principais fatores de virulência citados em *P. multocida* e que auxiliam no processo infeccioso em diferentes etapas são a cápsula e o lipolissacarídeo (LPS) (BOERLIN, 2010).

2.5.1 Cápsula

A cápsula de *P. multocida* é composta por polissacarídeos extracelulares localizados na superfície mais externa da célula, sendo considerada como portal de entrada para as células do hospedeiro (CHENG e COSTERTON, 1975; RIMLER e RHODES, 1989 apud MUTTERS, et al., 2003).

Cepas de *P. multocida* que expressam diferentes composições químicas da estrutura capsular foram identificadas. Por exemplo, cepas do tipo A expressam o polissacarídeo de cápsula composto por um polímero de alto peso molecular de ácido hialurônico (ROSNER, 1992 apud BOYCE et al., 2010). Amostras do sorogrupo D expressam um polissacarídeo capsular composto por polímeros de heparina e isolados do tipo F apresentam cápsulas compostas por polímero de condroitina (DE ANGELIS et al., 2002).

O ácido hialurônico, a heparina, a condroitina e demais polímeros capsulares são polissacarídeos denominados glicosaminoglicanos (GAG's). GAG's são componentes estruturais que apresentam um papel crítico na adesão celular e na regulação da atividade de várias proteínas. A presença de algumas destas moléculas na composição das células eucarióticas é um possível mecanismo de escape bacteriano à resposta imune do hospedeiro (BOYCE et al., 2010).

Entre as possíveis funções da cápsula, citam-se a proteção contra dissecação no meio ambiente, a fagocitose e a inibição do sistema complemento do soro (CHUNG et al., 2001). Estudos prévios sobre a virulência da cápsula de *P. multocida* têm usado derivados espontâneos de variantes acapsulares ou a remoção enzimática da cápsula (PRUIMBOOM, 1996 apud CHUNG et al, 2001; SAMBROOK, 1989 apud CHUNG et al, 2001). Estes estudos sugerem que há uma correlação entre a cápsula e a virulência de *P. multocida* (CHUNG et al., 2001).

Contudo, a análise de parte destes estudos mais antigos é prejudicada pela falta da seleção de amostras isogênicas e um não entendimento da síntese da cápsula em nível molecular (MUTTERS et al., 1989; BOYCE et al., 2000; CHUNG et al., 2001; BACK 2004, HARPER et al., 2006, EWERS et al., 2006).

2.5.2 Lipopolissacarídeos (LPS)

LPS são componentes típicos da parede celular de patógenos Gram negativos e atuam em dois papéis proeminentes: como fator de virulência e como imunógeno sorovar-específico. São considerados endotoxinas, pois apresentam pirógenos exógenos que podem ocasionar febre (KUBATZKY, 2012). Endotoxinas são produzidas por todas as cepas de *P. multocida*, tanto virulentas quanto não virulentas. Apesar de contribuírem para a virulência, a invasão e multiplicação das cepas são necessárias para a produção de quantidade suficiente de endotoxinas *in vivo* (GLISSON et al., 2008a). A toxicidade depende da interação entre a endotoxina e o hospedeiro, pois as diferenças estruturais entre os sorotipos de LPS podem afetar a intensidade da resposta imune inata (BOYCE et al., 2010).

Rimler (1990, apud MUTTERS et al., 2003) cita que a presença de cápsula não afeta o perfil do LPS. Mas os açúcares terminais descritos por Heddleston (1972) constituídos por tetrassacarídeos de sacarose e acetil-glucosamina são semelhantes aos resíduos presentes nos glicolípídeos das células eucarióticas, sendo possível que este mimetismo proporcione alguma vantagem de sobrevivência *in vivo* para *P. multocida* (BOYCE et al., 2010).

Possíveis mutações genéticas que resultem na formação incorreta do LPS, ou em sua não formação, acabam sendo críticas para a sobrevivência da bactéria, pois estão claramente envolvidos com o processo fagocítico sofrido pela célula bacteriana e resistência ao sistema complemento do hospedeiro (HARPER et al, 2006).

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

O mecanismo molecular fundamental da aderência de *P. multocida* nas células do hospedeiro ainda não é conhecido (DABO et al., 2003). Alguns microrganismos necessitam da motilidade e de quimiotaxia, assim como de resistência ao ácido gástrico e à bile para alcançar as células alvo no hospedeiro. O contato inicial é geralmente mediado pela bactéria patogênica através de adesinas fimbriais ou não fimbriais na sua superfície (KLINE et al., 2009). A ligação pode resultar em colonização extracelular ou na internalização do patógeno. As adesinas se ligam a receptores C de superfície das células do hospedeiro. O tipo de órgão e hospedeiro envolvidos podem determinar diferenças na capacidade de adesão entre as células animais e os

receptores para as adesinas bacterianas (GYLES e PRESCOTT, 2010). A expressão de OMP's por *P. multocida* é influenciada pelos níveis de ferro e reações cruzadas entre anticorpos de suínos e de aves, podendo influenciar na capacidade de adesão e sobrevivência da bactéria (ZHAO et al., 1995 *apud* CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006).

As fímbrias desenvolvem um papel na adesão às superfícies, e algumas cepas de *P. multocida* do sorogrupo A são hábeis na adesão ao epitélio das mucosas (HARPER et al., 2006). Fímbrias tipo IV ou Pili, isoladas dos sorotipos A, B e D de *P. multocida*, e associadas com a virulência em outras bactérias, são geralmente as mais estudadas (RUFFOLO et al., 1997; HARPER et al., 2006).

As outras proteínas de membrana de *P. multocida* são vinculadas a diferentes tecidos do trato respiratório de bovinos, aves, suínos e coelhos. Em estudos sobre adesão, a proteína de membrana *OmpA* demonstra capacidade de ligar-se a células dos rins de bovinos e de interagir com componentes da matriz extracelular, como fibromectina e heparina (DABO et al. 2003).

A proteína de membrana *OmpH* é uma das maiores proteínas de membrana descritas em *P. multocida*. Trabalhos vinculados à imunidade demonstram que esta proteína possui antígenos bacterianos que auxiliam a iludir a resposta imune do hospedeiro (DAVIES et al., 2003; LUO et al., 1999 *apud* BOYCE e ADLER, 2006). Furian et al. (2013) detectaram através de protocolos de multiplex-PCR, a presença do gene *OmpH* em 100% das amostras testadas (25/25), além de outros 12 genes associados à virulência de cepas de *P. multocida*. Outros estudos realizados demonstram a variabilidade dos genes *ompH* e *ompA* entre os diferentes sorogrupos de *P. multocida*.

Davies et al. (2003) determinaram por tipificação capsular os sorogrupos de 100 amostras de *P. multocida* provenientes de aves. Após esta análise, os autores procederam a extração de DNA das amostras em diferentes temperaturas, para averiguar sob qual temperatura de extração haveria uma melhor visualização das bandas dos genes *ompH* e *ompA*, obtendo uma temperatura ideal de aquecimento de 100°C. Os autores descrevem também que em amostras de mesmos sorogrupos os genes *ompH* e *ompA* possuem massas moleculares semelhantes, mas heterogêneas que podem prover à bactéria vantagens, já que o patógeno possui uma ampla variação antigênica dificultando, por exemplo, o desenvolvimento de vacinas.

2.6 – Métodos de diagnóstico e de estudos de patogenicidade

O diagnóstico presuntivo de CA pode ser baseado na ocorrência de sinais clínicos e de lesões típicas e/ou na demonstração microscópica da coloração bipolar característica da bactéria em amostras de tecidos como fígado, baço ou em esfregaços de sangue (SHIVACHANDRA et

al., 2003; FERRI et al., 2006). Suabes estéreis de algodão geralmente são recomendados para a coleta de amostras de material suspeito. Se a carcaça estiver em estado de decomposição avançado, a medula óssea pode ser examinada. Em suínos e outros animais com rinite atrófica, é comum a coleta de suabes dos turbinados nasais e seu estriamento em placas de AS ou incubadas em caldo BHI (*Brain-Heart Infusion* ou Infusão Cérebro-Coração). Aves suspeitas de carregarem *P. multocida* são amostradas pela cloaca ou pelas mucosas do trato respiratório superior (LEE et al., 2000; CHRISTENSEN e BISGAARD et al., 2006).

A detecção de *P. multocida* por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) também consiste em uma importante ferramenta para o rápido diagnóstico e para direcionar as ações a serem tomadas em casos confirmados (DZIVA et al., 2008; BRINGHENTI, 2011; FURIAN et al., 2013). O diagnóstico sorológico através de soroglutinação rápida (SARP), imunodifusão ou teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) podem apresentar resultados confusos em algumas situações. Por exemplo, nos casos de CA crônica, quando os níveis de anticorpos apresentam-se em quantidades não suficientes para um diagnóstico positivo. E também pode apresentar pequeno valor nos casos agudos, quando não houve tempo para a formação de uma resposta imune mensurável (NASCIMENTO et al., 2009).

As amostras coletadas para o isolamento de *P. multocida* podem ser inoculados em coelhos, hamsters ou camundongos pelas vias subcutânea ou intraperitoneal, com um volume de 0,2 mL de solução bacteriana *overnight*. Em casos positivos, a morte ocorre em 24 a 48 horas, e o reisolamento pode ser realizado a partir do fígado, do sangue ou do coração dos animais (NASCIMENTO et al., 2009).

Ensaio experimentais com a utilização de galinhas, camundongos ou ovos férteis de galinhas têm sido amplamente utilizados em estudos de patogenicidade de *P. multocida* (IBRAHIM et al., 1998; SHIVACHANDRA et al., 2006). Tais estudos também avaliam diferentes rotas de inoculação, como as vias intramuscular, intratraqueal, intravenosa e conjuntival para se tentar esclarecer a porta de entrada da bactéria durante os casos de CA (WILKIE et al., 2000). Porém, ferramentas para a tipificação e identificação de amostras virulentas de *P. multocida* associadas com casos de CA ainda precisam ser desenvolvidas (CHRISTENSEN E BISGAARD, 2006). Camundongos são altamente susceptíveis à bactéria *P. multocida* (PATEL, 2004). Kumar et al. (1996) testaram 43 isolados de *P. multocida* de diferentes espécies animais. O teste de patogenicidade foi realizado em três camundongos para cada amostra, pela inoculação de 0,2 mL de um caldo de cultura de 18 horas pela via intraperitoneal e observados durante 48 horas. Todos os 43 isolados mataram os camundongos dentro do período de 24 a 48 horas, e a bactéria foi reisolada do sangue cardíaco dos animais e

confirmado o diagnóstico através do cultivo bacteriano, de testes bioquímicos e de testes sorológicos.

Rajini et al. (1995) realizaram um teste de patogenicidade de 30 amostras coletadas de aves suspeitas de CA. Os materiais coletados de cada ave foram homogeneizados e 0,1 mL de cada amostra foram inoculados por via intraperitoneal em camundongos. As amostras de todas as aves foram letais para os camundongos, embora tenha havido variação nas suas virulências, de acordo com a análise da Média do Tempo de Morte (MTM). As cepas com uma MTM de 10 horas foram consideradas as mais virulentas. A maioria dos isolados apresentou uma MTM entre 10 e 18 horas e apenas um isolado apresentou uma baixa virulência com um MTM de 25 a 30 horas. De maneira semelhante, Balakrishnan e Mini (2001) realizaram um teste de patogenicidade com 4 isolados provenientes de patos e de galinhas a partir da inoculação de camundongos, coelhos, galinhas e patos. O teste de patogenicidade dos isolados resultou na morte de todos os camundongos em 24 a 48 horas, porém não houve classificação de patogenicidade das cepas inoculadas.

Em seu estudo, Huberman et al. (2011) utilizaram amostras de *P. multocida* provenientes de aves e inocularam 0,1 mL do inóculo em BHI *overnight* em 5 pintos de dois dias de idade por via subcutânea. Após 24 horas de observação, apenas uma ave morreu. Os órgãos da ave morta foram coletados, macerados e, em seguida, inoculados em caldo BHI para incubação *overnight*. Esta solução foi novamente inoculada em 5 pintinhos de 3 dias de idade, dos quais 4 morreram. O procedimento foi repetido mais uma vez, no qual todas as aves inoculadas morreram. Os autores então perceberam que a cepa apresentou maior patogenicidade a cada passagem da bactéria pelo hospedeiro.

A inoculação experimental por via oral de 1 mL de soluções contendo $6,25 \times 10^6$ UFC/mL de *P. multocida* em aves de 52 semanas de idade foi realizada por Rahman et al. (2004). Durante a necropsia, os autores observaram a ocorrência de lesões nodulares na superfície do fígado e hemorragias intestinais dos animais.

Ibrahim et al. (1998) inocularam 0,1 mL de caldos de cultivos de 4 diferentes amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos de CA em duas concentrações (10^7 e 10^3 UFC). Cada uma das amostras e concentrações foi inoculada em 5 ovos com embriões de 11 dias através da membrana córioalantóide. Após a inoculação, os mesmos foram avaliados duas vezes ao dia, durante 3 dias, através de ovoscopia. Os parâmetros analisados foram mortalidade e o tempo de morte embrionários. Todos os embriões mortos também foram avaliados quanto à severidade de lesões que apresentavam e os fluídos dos mesmos foram submetidos a cultivos bacterianos, confirmando a morte pela bactéria. Duas das amostras, consideradas virulentas, mataram todos

os embriões entre 24 e 38 horas após a inoculação. As lesões patológicas encontradas para estas amostras foram: severa congestão de todo o embrião, edema na cabeça e hemorragias nos folículos das penas e nos pés. O fígado apresentava-se aumentado e severamente congesto. A membrana córioalantóide apresentava petéquias hemorrágicas e os pulmões congestos. Os autores conseguiram recuperar a bactéria de todos os embriões mortos. Ainda neste estudo, houve resultados similares entre as mortalidades das cepas consideradas de alta e média virulência, porém a cepa considerada de baixa virulência foi associada com uma baixa taxa de mortalidade embrionária. Os autores ainda concluem que a dose que aparentemente deve ser mais adequada para estudar as diferenças de virulência entre as amostras para este modelo animal é de 10^5 UFC.

Schivachandra et al. (2006) inocularam, através da membrana córioalantoide de ovos embrionados, 0,1 mL de BHI contendo diluições seriadas entre $2,5 \times 10^{10}$ e 25 UFC de uma cepa de *P. multocida* pertencente ao sorogrupo A:1. Cada concentração foi inoculada em 4 ovos. Todos os embriões mortos foram examinados para a presença de lesões macroscópicas, e uma amostra de cada embrião foi cultivada em ágar sangue (AS) para confirmação de diagnóstico por cultura convencional. Além disto, este estudo analisou a capacidade de detecção de PM sorogrupo A:1, através de ensaios de PCR em fluido alantóico, fluido amniótico e homogeneizados de embrião e de suas membranas extraembrionárias, produzindo bons amplicons, de tamanhos esperados. Confirmando que o diagnóstico por PCR é de fácil realização e consome menos tempo do que a metodologia de diagnóstico por cultura convencional.

Pilatti et al. (2016) determinaram a DL_{50} para aves de corte de um dia inoculadas com *Pasteurella multocida* como sendo 10^5 UFC. No mesmo trabalho, o autor utilizou volumes de 0,1 mL contendo a DL_{50} estabelecida para a realização de testes de patogenicidade com amostras oriundas de casos clínicos de CA e isolados de suínos. Foram utilizadas 97 amostras no estudo, sendo que cada amostra foi inoculada por via intraperitoneal, em grupos 10 aves de um dia, e estas foram acompanhadas durante um período de sete dias. Neste trabalho, o autor conseguiu estabelecer relações entre a espécie de origem das amostras e o hospedeiro desafiado, bem como estabelecer índices de patogenicidade baseados no tempo de morte e lesões macroscópicas decorrentes da prévia infecção, semelhantes ao estudo desenvolvido por Souza et al. (2016) com *E. coli* de origem aviária.

Emery et al. (2017), utilizaram 94 amostras de *P. multocida* para realização de estudos de patogenicidade em camundongos. Após prévia determinação da DL_{50} , os autores procederam sua análise através da inoculação de 0,1 mL de suspensão bacteriana contendo 10^5 UFCs por

via intraperitoneal. Para cada amostra, foram utilizados 5 camundongos na avaliação de patogenicidade. Do mesmo modo que Pilatti et al. (2016), os autores obtiveram após sete dias de observação diferentes perfis de patogenicidade para as amostras analisadas, conseguindo estabelecer um índice de patogenicidade específico para o modelo animal em questão.

2.7 Métodos de tipificação molecular dos isolados

Pasteurella multocida é um organismo diversificado e uma bactéria complexa no que diz respeito a sua variação antigênica, predileção por hospedeiro e patogênese (Sarangi et al., 2014). Nas duas últimas décadas, diversas metodologias de caracterização molecular foram desenvolvidas para identificar e detalhar a estrutura desta população bacteriana. Estes trabalhos buscaram determinar quais genes estão presentes e suas interações com a virulência das amostras analisadas (TOWNSEND et al., 1998; TOWNSEND et al., 2001; KALOREY et al., 2008; SUBAAHARAM et al., 2010; MIR et al., 2011; WANG et al., 2013; VERMA et al., 2013; PANNA et al., 2015; OKAY et al., 2015; ZHAO et al., 2016; FURIAN et al., 2016a; FURIAN et al., 2016b).

Um dos métodos biomoleculares utilizados nestes estudos foi a técnica de PCR-RFLP. Nesta técnica os 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 (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) 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 (ZAHA et al., 2014).

Pesquisas baseadas na análise e na discriminação do gene *ompH* e na estrutura do LPS são alguns exemplos de trabalhos que utilizaram a técnica de PCR-RFLP em *P. multocida* (BOROWSKI et al., 2002; JABBARI et al., 2005, TSAI et al., 2011, SELLYEI et al., 2013, FURIAN et al., 2016a).

Jabbari et al. (2005) realizaram a amplificação de um fragmento do gene *ompH* e a posterior digestão com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *CfoI*, conseguindo classificar os 25 isolados de *P. multocida* analisados em cinco diferentes perfis. Em 2011, Tsai e colaboradores realizaram a clivagem do amplicon de genes associados com a biossíntese da região do core do LPS com a enzima *HincII* e também agruparam as cepas de *P. multocida* em cinco grupos (TSAI et al., 2011).

Gautam et al. (2004), ao realizar estudo com 150 amostras de *P. multocida* sorotipo A, identificaram através de PCR o gene *hyaC-hyaD* localizado na região 2 do *locus* de biossíntese. Neste mesmo estudo, os autores conseguiram amplificar em 50 amostras de *P. multocida* um

produto com 564 pb. A amplificação deste produto foi consistente com os isolados do sorogrupo A. Este produto de PCR foi submetido à digestão pela enzima *BglII*, resultando em uma restrição padrão idêntica entre todos os isolados, independentemente dos tipos somáticos e da origem. Este protocolo de PCR RFLP permite relativa facilidade na interpretação dos padrões de restrição das amostras provenientes do sorotipo A.

Furian et al. (2016a) ao analisar 56 cepas de *P. multocida* de origem aviária, através da técnica de PCR-RFLP do gene *ompH* digerido com a endonuclease de restrição *DraI*, obtiveram 5 diferentes perfis moleculares. Dois perfis não sofreram digestão pela *DraI*, mas foram distinguíveis após sofrerem clivagem pela *HindIII*. Os autores relacionaram os sete perfis obtidos neste estudo com índices de patogenicidade pré-estabelecidos por Pilatti et al. (2016), mostrando que existem diferenças estatísticas ao classificar os índices de patogenicidade de cada amostra de *P. multocida* obtidos em modelo experimental de pintos de um dia, dentro dos perfis de RFLP por ele observados.

2.8 Estrutura da Tese

Ao longo das duas últimas décadas o CDPA vem atuando de forma diferenciada no desenvolvimento de pesquisas para a avaliação da relação entre hospedeiros e patógenos. São diversos os estudos realizados que envolvem a interação da imunidade do hospedeiro com a capacidade de infecção e a virulência dos microrganismos estudados, objetivando avaliar ao longo do tempo as flutuações na virulência dos agentes para auxiliar em uma tomada de decisão assertiva, em momento oportuno. Avaliações de depleção linfocitária realizadas por Moraes et al. (2010) e Carvalho et al. (2016) são alguns dos trabalhos desenvolvidos que se referem a avaliação imunológica dos hospedeiros. Do outro lado, em um primeiro momento, o CDPA desenvolveu uma linha de pesquisa para avaliação de patogenicidade e associação de perfis genéticos e resistência a antimicrobianos para amostras de *E. coli*. Dentre os diversos trabalhos e correlações estabelecidas, houve a inserção e o treinamento de redes neurais artificiais (RNAs), cuja aplicação e predição de índices patogênicos e resistência a antimicrobianos para *E. coli* foi bem estabelecida (SOUZA et al., 2016).

Seguindo nesta mesma linha de pesquisa, trabalhos similares estão sendo realizados com o intuito de desenvolver a construção de novas redes neurais para amostras de *Salmonella sp.* e *Pasteurella multocida* ao longo da última década (FURIAN et al., 2013; FURIAN et al., 2014; FURIAN et al., 2016a; FURIAN et al., 2016b; PILATTI et al., 2016; EMMERY et al., 2017; LIMA et al., 2016). Porém, mesmo com os mais diversos estudos já realizados, ainda não possuímos dados suficientes para elaborar redes neurais para estas duas espécies bacterianas.

Este trabalho foi desenvolvido a partir de um conjunto de estudos realizados ao longo da última década, e será apresentado da seguinte maneira:

- Artigo 1 - *Establishment os a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to Pasteurella multocida Strains Isolated from Clinical cases in Poultry and Swine* (ANEXO B).

- Artigo 2 - *Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of CPasteurella multocida* (ANEXO C).

- Artigo 3 - *Evaluation of the biofilm formation capacity of Pasteurella multocida strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity* (ANEXO D).

- Artigo 4 - *Identification of the Capsule Type of Pasteurella multocida isolates from Cases of Fowl Cholera by multiplex PCR and Comparison with Phenotypic Methods* (ANEXO E).

- Explicação do atual estudo, que estabelece um índice de patogenicidade para amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de casos clínicos de aves e suínos em modelo experimental de ovos embrionados, além da comparação dos três diferentes modelos animais para a avaliação de patogenicidade e associação de índices de patogenicidade obtidos em camundongos a diferentes perfis moleculares pré-estabelecidos e sorogrupos capsulares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA)

A etapa do projeto que envolve o uso e a inoculação de ovos embrionados SPF foi submetida para avaliação e parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), tendo em vista que a experimentação animal foi realizada nas dependências do biotério desta instituição (APÊNDICE A).

3.2 Locais de Estudo

Com exceção à etapa de realização da inoculação de ovos embrionados SPF (executada no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor -IPVDF), todas as demais atividades planejadas - reisolamento microbiológico e testes de biologia molecular, bem como a análise dos dados obtidos – foram realizadas nas instalações do CDPA (Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.3 Amostras

Para a realização deste estudo, foram selecionadas 97 amostras de *Pasteurella multocida*. Dentre estas, 56 amostras foram obtidas de casos clínicos de CA e 41 foram isoladas de suínos e de javalis. As amostras de camundongos e de búfalos serão enquadradas durante o estudo conjuntamente com as amostras de suínos. Todas as amostras encontravam-se estocadas em sangue puro ovino à temperatura de -70°C no CDPA.

Para a reativação destas amostras, foi utilizado o caldo de cultura não seletivo BHI. Uma alíquota de 20µL da solução estoque de *P. multocida* foi transferida para 5 mL de caldo BHI e os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram estriadas em dois meios distintos: ágar sangue (Oxoid®), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado, e em ágar MacConkey (Oxoid®). O primeiro representa uma importante fonte de nutrientes para as bactérias do gênero *Pasteurella spp.*, enquanto o crescimento de *P. multocida* é inibido pelo segundo.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica nas mesmas condições citadas anteriormente. Depois deste período, procedeu-se a identificação das características morfológicas das colônias e a realização de provas bioquímicas de catalase e de oxidase. Após estes passos, colônias representativas de cada amostra foram selecionadas para a realização de

um protocolo de PCR para a identificação de genes espécie específicos, conforme protocolo descrito por Townsend et al. (1998) com adaptações.

3.4. Inoculação de Ovos Embrionados SPF e Determinação dos Índices de Patogenicidade

3.4.1 Aquisição e manutenção de ovos embrionados SPF

Os ovos embrionados foram adquiridos da Granja Rezende, produtora de ovos SPF (*Specific Pathogen Free*) em Uberaba, Minas Gerais. Após recepção, os ovos embrionados SPF foram acondicionados em temperatura limítrofe (abaixo de 24°C – zero fisiológico de ovos de frangos de corte) para inibição do desenvolvimento embrionário até o momento da incubação (FAZENKO et al., 1992). Os ovos embrionados foram incubados em uma temperatura entre 37,5°C e 38°C, com aproximadamente 60% de umidade relativa do ar (URA), conforme recomendado pelo manual das incubadoras utilizadas (PREMIUM ECOLÓGICA®, 2000), e avaliados diariamente quando à viabilidade embrionária através de ovoscopia, conforme Figura 1. As incubadoras possuem sistema de viragem automático, o que proporciona uma maior superfície de contato dos ovos com o ambiente de incubação, assim evitando que haja aderência embrionária à membrana da casca do ovo, principalmente na primeira semana de desenvolvimento.

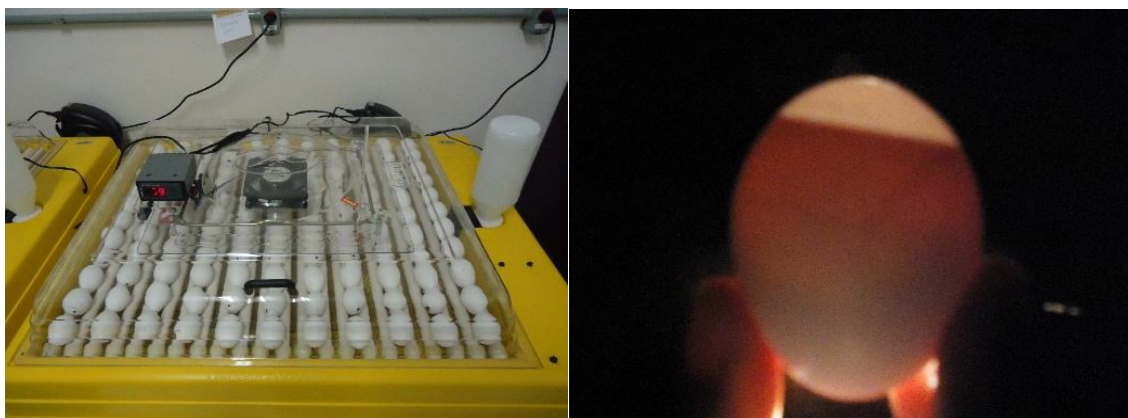
Os ovos embrionados foram individualmente identificados, sendo que cada amostra de *P. multocida* foi inoculada em grupos formados por 3 ovos. Após inoculação, realizou-se ovoscopia diariamente de 12 em 12 horas, sendo os ovos avaliados quanto à viabilidade embrionária durante sete dias (Figura 1). Embriões imóveis e sem pulsação venosa foram considerados mortos. Estes embriões foram necropsiados para a avaliação de alterações, e fragmentos de coração e fígado foram cultivados em meios nutritivos para a tentativa de reisolamento bacteriano.

Após os sete dias de avaliação, os ovos que apresentaram embriões sobreviventes foram submetidos à processo de eutanásia, através de congelamento, a -20°C por aproximadamente 30 minutos com posterior decapitação. Assim como os embriões que morreram durante o estudo, estes também foram necropsiados para a avaliação macroscópica e realizada também a tentativa de reisolamento bacteriano. O líquido amniótico dos embriões foi coletado e posteriormente será utilizado em tentativa de diagnóstico de *P. multocida* através do protocolo descrito por Townsend et al. (1998) com adaptações.

3.4.2 Dose Letal 50%

Para a definição das concentrações dos inóculos e do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) que foram utilizados em cada bateria de infecção experimental, foi realizado um projeto piloto para estabelecer a Dose Letal para 50% dos ovos embrionados SPF (DL₅₀).

Figura 1 - Ovos mantidos na incubadora e avaliação da viabilidade embrionária por ovoscopia.



Fonte: autor.

Três diferentes cepas de *P. multocida* foram incubadas em BHI *overnight*, a partir das quais obtivemos soluções contendo 10⁸ UFC/mL. Estas soluções iniciais foram diluídas seriadamente até 10⁻⁹. De cada solução seriada foram instilados 0,1 mL em 6 ovos embrionados SPF, contendo embriões com 11 dias de desenvolvimento. Estas inoculações foram realizadas através da cavidade córioalantoide e no total foram utilizados 60 ovos SPF por amostra. O valor de DL₅₀ foi então calculado conforme a equação descrita por Reed e Muench (1938).

3.4.3 Preparo do Inóculo

O preparo do inóculo foi padronizado para todas as amostras, conforme a técnica adaptada de Borsoi et al., (2009). Resumidamente, foi realizada a suspensão em 5 mL de BHI de uma colônia de *P. multocida*, proveniente de um cultivo *overnight* a 37°C em ágar sangue (Oxoid®), adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado. Após a suspensão bacteriana, as soluções foram homogeneizadas e realizadas subsequentes diluições seriadas em solução salina 0,85% estéril. Uma alíquota de 20 µL de cada diluição foi pipetada em quintuplicata em placas de AS para a contagem em placa do número de UFCs presentes, de acordo com a técnica descrita por Sant'Anna e Cerqueira (2007), representada na Figura 3.

De acordo com a técnica, o número de colônias obtidos na quintuplicata foi ajustado multiplicando-se o número de colônias obtido nas 5 gotas por 50 (fator de correção de 20 µL

para 1 mL) e dividindo por 5 (número de gotas). Após este cálculo, foi estabelecida a relação da diluição analisada assim obtendo-se a média em 10^8 UFC/mL de cada amostra.

Figura 2 - Técnica de inoculação via cavidade córioalantoide, utilizada nos ovos embrionados.



Fontes: FAO.org/ autor.

Figura 3 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) através da técnica da gota.



Fonte: Pilatti, 2014.

3.4.4 Cálculos dos índices de patogenicidade

Os cálculos do Índice de Patogenicidades foram baseados no trabalho descrito por Souza et al. (2016), Emery et al. (2017) e Pilatti et al. (2016). Para a sua determinação, o Tempo de Morte (TM) foi utilizado conjuntamente com a avaliação da presença de lesões macroscópicas. Os dois critérios receberam pontuações específicas de acordo com as lesões macroscópicas que foram avaliadas.

Os embriões que morreram nas primeiras 12 horas pós-inoculação receberam escores máximos para o TM avaliado. A partir das 24 horas até o final do sétimo dia, foram realizadas diminuições proporcionais ao valor inicialmente atribuído a este critério, calculando-se um Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) da seguinte maneira: o fator máximo de TM (1) foi dividido pelos 7 dias em que os estudos foram avaliados, obtendo-se o valor de 0,1428 porém como as avaliações eram a cada 12 horas, este valor foi dividido por 2, para avaliação de acordo com as ovoscopias realizadas. Assim, para cada avaliação ovoscópica (12 hs) em que os embriões desafiados sobreviveram foram diminuídos 0,076923 do fator máximo estabelecido. Os valores obtidos para o TM foram multiplicados pelo valor 5, correspondente ao escore de pontos.

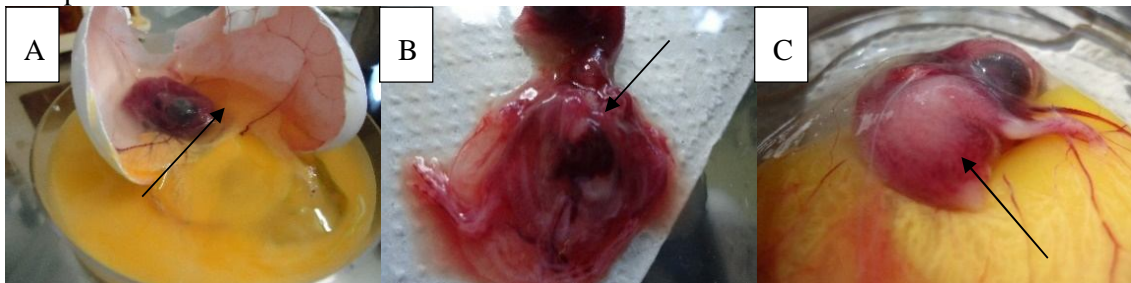
Embriões desafiados que sobreviveram aos sete dias de avaliação, e que conseqüentemente foram eutanasiados no sétimo dia pós-inoculação (p.i.), receberam o valor zero (0) para o critério Tempo de Morte. Os TM, seus respectivos valores de bonificação de sobrevivência, bem como a pontuação atribuída às lesões observadas durante a realização do estudo, encontram-se demonstradas na Tabela 1. Na Tabela 1 estão demonstrados os fatores de bonificação de sobrevivência correspondentes aos tempos de morte avaliados, bem como os valores atribuídos a cada uma das lesões avaliadas para o modelo experimental de ovos embrionados.

A pontuação atribuída ao Escore de Lesões (EL) avaliadas foi complementar ao fator de TM, e seu somatório foi correspondente ao valor limite de 10. Por exemplo, se o fator TM for 1, o valor máximo que foi atribuído ao EL observado neste modelo foi de 5. Os embriões que morreram nas primeiras 12 horas p.i. receberam escores máximos para os dois critérios avaliados, resultando no Índice de Patogenicidade Individual (IPI) máximo de 10, conforme o exemplo de cálculo demonstrado no APÊNDICE A.

As lesões macroscópicas que foram observadas e analisadas para a realização deste estudo estão baseadas no trabalho realizado por Ibrahim et al., (1998) e Mohamed et al. (2012), sendo elas: congestão embrionária, hemorragias nos folículos das penas e congestão hepática.

A Figura 4 demonstra as lesões obtidas durante a avaliação *post-mortem* dos embriões desafiados.

Figura 4 - Lesões macroscópicas observadas durante a necropsia dos embriões inoculados com as cepas de *Pasteurella multocida*.



Fonte: o autor. A – Embrião Hemorrágico. B – Congestão Hepática. C- Congestão dos Folículos das penas.

Tabela 1. Escores atribuídos aos tempos de morte de acordo com FBS correspondente ao tempo transcorrido p.i. e às lesões macroscópicas observadas nos embriões.

Fator de Bonificação de Sobrevivência			Escore de Lesões			
			Lesões			
Tempo p.i. (hs)	TM	TM x 5	EH	CH	CFI	EL
12	1	5	3	1	1	5
24	0,923077	4,615385				
36	0,846154	4,230769				
48	0,769231	3,846154				
60	0,692308	3,461538				
72	0,615385	3,076923				
84	0,538462	2,692308				
96	0,461538	2,307692				
108	0,384615	1,923077				
120	0,307692	1,538462				
132	0,230769	1,153846				
144	0,142857	0,769231				
156	0,076923	0,384615				
168*	0	0				

168* - aves que sobreviveram até o sétimo dia e foram eutanasiadas.

Seguindo os parâmetros da Tabela 1, o cálculo de Índice de Patogenicidade Individual (IPI) foi obtido de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IPI} = (\text{TM} \times 5) + (\text{EH} \times 3) + (\text{CH}) + (\text{CFI})$$

Onde:

IPI = Índice de Patogenicidade Individual

TM = Tempo de Morte – para os embriões que permanecerem vivos e precisarem ser eutanasiadas (168*), o valor de TM atribuído foi 0.

EH – Embrião hemorrágico

CH – Congestão hepática

CFI – Congestão do folículo da pena

Para o estabelecimento do Índice de Patogenicidade (IP) de cada amostra que foi inoculada, os valores obtidos através do cálculo do IPI, foram somados para obtenção da média aritmética, de acordo com a equação abaixo:

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

Onde:

IP = Índice de Patogenicidade da Amostra

\sum IPI = Somatório dos Índices de Patogenicidade Individual

N = Número de embriões inoculados

No APÊNDICE A encontra-se representado o exemplo do cálculo realizado para determinação do IP das amostras.

3.5 Comparação dos índices de patogenicidade obtidos em diferentes modelos animais

A taxa de mortalidade, o tempo de morte, as lesões macroscópicas e o percentual de reisolamento bacteriano obtidos através da inoculação das amostras de *Pasteurella multocida* em ovos embrionados SPF realizada no atual estudo, em pintos de corte de um dia de idade (PILATTI et al., 2016) e em camundongos (EMERY et al., 2017) foram comparados. A partir da análise dos parâmetros anteriores e da distribuição dos índices de patogenicidade obtidos para cada amostra, foi determinado qual o modelo animal é mais adequado para a realização de testes *in vivo* para a avaliação de patogenicidade de *P. multocida*.

Os índices de patogenicidade em pintos de um dia (PILATTI et al., 2016) e camundongos (EMERY et al., 2017) já estabelecidos para as cepas estudadas de *Pasteurella multocida* constam nos APÊNDICES B e C.

3.6 Associação dos perfis moleculares obtidos através de PCR-RFLP e dos sorogrupos A e D de *Pasteurella multocida* com índices de patogenicidade obtidos através da inoculação em camundongos

Em estudo anterior realizado no CDPA, as 56 cepas de *Pasteurella multocida* de origem avícola selecionadas para este trabalho foram classificadas em sete grupos moleculares obtidos através da técnica de PCR-RFLP a partir da amplificação do gene *ompH* (FURIAN et al., 2016a). No atual estudo, os grupos moleculares resultantes foram relacionados aos índices de patogenicidade obtidos na inoculação experimental de *P. multocida* em camundongos, descritos no APÊNDICE B (EMERY, 2016).

Da mesma forma, as cepas de *P. multocida* anteriormente classificadas nos sorogrupos A, B e D de *Pasteurella multocida* (FURIAN, 2016a) através de técnica de multiplex-PCR padronizada no CDPA (FURIAN et al., 2013) foram relacionadas aos índices de patogenicidade obtidos através da inoculação experimental de camundongos (EMERY, 2017).

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos no presente estudo foram analisados pelo programa computacional GraphPad Prism® 7, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.

Em função deste tipo de dados geralmente não seguir uma distribuição normal, os testes estatísticos que foram utilizados são os testes para dados não paramétricos de Kruskal-Wallis, Mann Whitney, Dunn's, Tukey e coeficiente de correlação de Spearman. 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dose Letal 50%

Após a realização das inoculações com as diluições seriadas das 3 amostras de *Pasteurella multocida* para o estabelecimento da DL₅₀, realizamos os cálculos de acordo com as equações de Reed e Muench (1938). As diluições ideais e as respectivas concentrações das soluções bacterianas obtidas para cada uma das amostras de *P. multocida* estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Apresentação das diluições ideais e concentrações bacterianas para cada uma das três amostras de *Pasteurella multocida* utilizadas.

Amostra	DL ₅₀	Concentração UFC/mL
01	10 ^{6.2}	10 ²
13	10 ^{6.35}	10 ²
809	10 ^{6.47}	10 ³

Dose Letal de 50% dos embriões inoculados com solução de partida contendo 10⁸ UFC/mL de *Pasteurella multocida* (6 ovos embrionados SPF/amostra/diluição).

Conforme os resultados obtidos neste primeiro estudo, houveram duas amostras em que as concentrações bacterianas foram de 10² UFC/mL e apenas uma delas em que a concentração ficou em 10³ UFC/mL. Para evitarmos a utilização de doses subconcentradas, optamos por empregar como DL₅₀ padrão para a execução do atual estudo a concentração de 10³ UFC/mL.

Outros autores utilizaram esta mesma concentração para inoculação de amostras de *P. multocida*. Ozbey e Muz (2006) inocularam 16 camundongos com 10³ UFC/ mL de *P. multocida*. Em doze destes animais (75%), a bactéria pode ser reisolada das amostras de sangue cardíaco e pulmões dos camundongos mortos. Todavia, *P. multocida* não pode ser isolada de quatro camundongos (25%) inoculados com amostras que foram positivas em cultura e PCR.

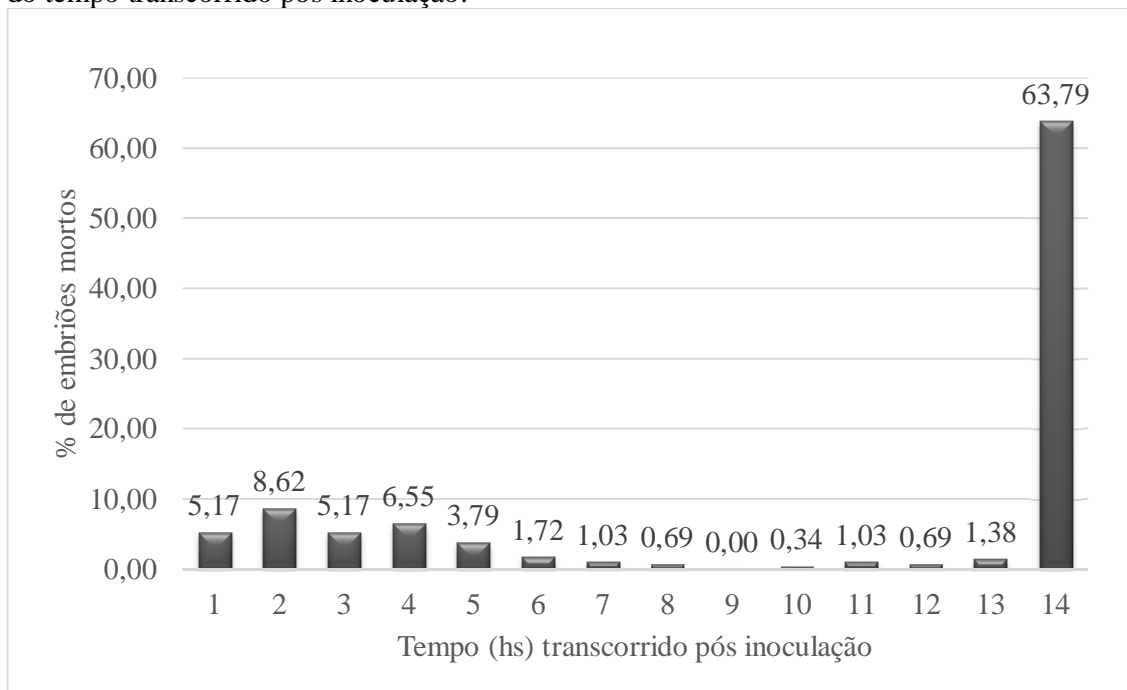
Ibrahim e colaboradores (1998) inocularam através da membrana córioalantoide ovos embrionados com 11 dias de desenvolvimento e avaliaram a dose-resposta de diferentes diluições das mesmas amostras (10⁷, 10⁵, 10³ UFC/mL), onde observaram mortalidade em todos os embriões inoculados, bem como foi possível a recuperação da bactéria de todos os embriões, e em todas as doses.

4.2 Relação da mortalidade com o tempo de morte avaliado

De acordo com resultados obtidos no estudo, houve uma mortalidade de aproximadamente 31% dos embriões nos 3 primeiros dias pós-inoculação (pi). Os dias

intermediários (4,5,6 dias p.i.) apresentaram uma reduzida taxa de mortalidade. Ao final do período de 7 dias de avaliação, um total de 36,4% dos embriões morreram e 63,6% foram eutanasiados, conforme demonstra o Gráfico 1.

Gráfico 1 - Distribuição da mortalidade embrionária durante o período de avaliação em função do tempo transcorrido pós inoculação.



168* = embriões que não morreram e foram eutanasiados no sétimo dia pós-inoculação.

A distribuição da mortalidade de acordo com o tempo de morte teve maior expressividade nos dois primeiros dias pós inoculação, sendo estes responsáveis por aproximadamente 25,3% da mortalidade total (Gráfico 1).

A Tabela 3, demonstra a distribuição dos percentuais de mortalidade dos animais de acordo com a origem das amostras. É possível observar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as mortalidades analisadas para as diferentes espécies, bem como no percentual de embriões sobreviventes para as diferentes espécies de origem das cepas de *P. multocida*.

Ibrahim e colaboradores (1998) inocularam através da membrana córioalantoide ovos embrionados com 11 dias de desenvolvimento, utilizando 0,2 mL de solução contendo 10^8 e 10^7 UFC/mL de diferentes amostras de *P. multocida*. As amostras sabidamente patogênicas foram capazes de matar 60 a 80% dos embriões em até 48 horas após a inoculação.

Tabela 3 - Distribuição da frequência de mortalidade dos embriões inoculados de acordo com o tempo transcorrido (hs) pós inoculação, para as diferentes origens das amostras de *Pasteurella multocida*.

Origem	Tempo (hs) transcorrido pós inoculação														Total
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168*	
Aves	6 ^a	17 ^a	12 ^a	14 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a	3 ^a	1 ^a	3 ^a	103 ^a	168
Suínos	9 ^a	8 ^a	3 ^a	5 ^a	7 ^a	4 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a	82 ^a	123

Teste de Mann-Whitney. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos analisados ($p < 0,05$).

168* = aves que não morreram e foram eutanasiadas no sétimo dia pós-inoculação.

Mohamed et al. (2012) inocularam via membrana córioalantoide 0,1 mL de soluções contendo 10^5 UFC/mL de *P. multocida* de 5 diferentes amostras em ovos embrionados com 11 dias de desenvolvimento. Todos os embriões inoculados com as 5 diferentes cepas morreram. Alguns deles levaram até 124 horas para morrerem, indicando que as amostras envolvidas nestas mortes embrionárias tardias fossem menos patogênicas.

4.3 Presença de lesões e reisolamento bacteriano

Na Tabela 4, são descritas as lesões *post mortem* encontradas no estudo, bem como a frequência de observação nos embriões e a frequência de reisolamento bacteriano em relação às origens das amostras inoculadas. Percebe-se que em todas as situações as cepas de origem suína apresentaram uma menor frequência de observação das lesões do que as amostras de origem aviária, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Infecções experimentais realizadas anteriormente por Ibrahim et al. (1998) e Mohamed et al. (2012) utilizaram amostras de *P. multocida* inoculadas em ovos embrionados e após avaliação macroscópica dos embriões, as lesões mais comuns encontradas foram: saco da gema congesto, embriões hemorrágicos, fígado congesto, congestão dos folículos das penas, presença de petéquias na membrana alantóide. As lesões observadas por estes autores foram similares às lesões avaliadas no presente estudo.

A Tabela 4 demonstra a não observação de diferença estatísticas entre as taxas de reisolamento bacteriano de acordo com as espécies de origem. Os resultados diferem do que foi observado por Pilatti e colaboradores (2016) quando estes avaliaram cepas de aves e suínos inoculados em modelo experimental de pintos de um dia e de Emery et al. (2017) que avaliou parâmetros similares em inoculação experimental em camundongos.

Tabela 4 - Comparação da frequência absoluta das lesões avaliadas e do reisolamento das amostras de *Pasteurella multocida* diagnóstico das lesões e reisolamento bacteriano nos grupos de embriões inoculados, de acordo com a origem das amostras.

Amostras	n	Lesões Embrionárias			Reisolamento
		EH	CH	CFI	
Aves	168	65 ^a	58 ^a	62 ^a	71 ^a
Suíños	123	31 ^a	44 ^a	34 ^a	35 ^a

Teste de Mann-Whitney. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos analisados ($p < 0,05$). Onde “n” representa o número total de embriões inoculados de cada origem, EH representa a lesão de Embrião Hemorrágico, CH representa lesão de Congestão Hemorráica, CFI representa a lesão de Congestão do Folículo da pena.

4.4 Índices de Patogenicidade

As 97 cepas de *P. multocida* foram classificadas conforme os Índices de Patogenicidade (IP) obtidos em três diferentes grupos (Gráfico 2). A análise das medianas dos índices de acordo com a origem dos isolados não apresentou diferença estatística, conforme demonstram os dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a origem das amostras de *Pasteurella multocida*.

Origem	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Aves	56	2,00 ± 1,749 ^a
Suíños	41	1,67 ± 1,774 ^a

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos analisados ($p < 0,05$).

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, quando as mesmas amostras foram inoculadas em pintos de um dia e camundongos revelaram diferença estatística, sendo que as amostras de origem avícola foram consideradas mais patogênicas qua as isoladas de suínos (PILATTI et al., 2016; EMERY et al., 2017).

No Gráfico 2, as cepas das duas diferentes origens estão distribuídas nos três grupos de classificação do IP: Alta (IP de 8 a 10), Média (IP de 4 a 7) e Baixa patogenicidade (IP de 0 a 3).

A Tabela 6 apresenta a distribuição em conjunto das 97 amostras de *P. multocida* nos três diferentes grupos conforme o IP obtido. Os resultados demonstram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores da mediana do IP entre os grupos de patogenicidade.

Gráfico 2 - Distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* de acordo com a origem nos grupos de patogenicidade.

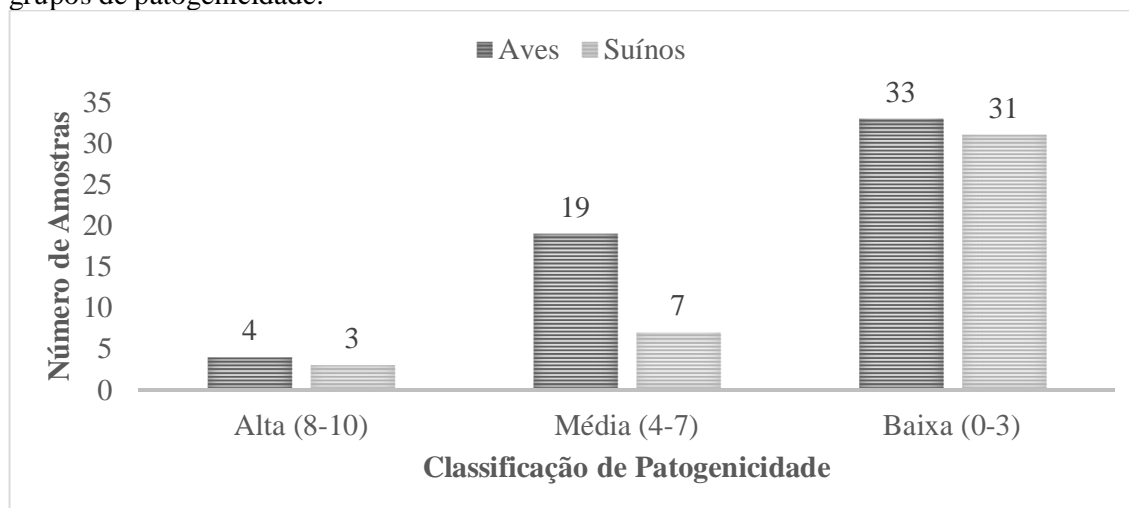


Tabela 6 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* de origem aviária e suína nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana \pm DP
Alta	7	8,77 \pm 0,335 ^a
Média	26	5,23 \pm 0,884 ^b
Baixa	64	1,33 \pm 1,432 ^c

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 7 apresenta as 56 amostras de *P. multocida* de origem avícola distribuídas por classificação de patogenicidade, conforme o IP obtido. Do total destas amostras, 4 foram classificadas como de alta patogenicidade, 19 como média e 33 como de baixa patogenicidade. As análises revelam que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre as três classificações de patogenicidade. As inoculações realizadas em camundongos e pintos de um dia por Emery et al. (2017) e Pilatti e colaboradores (2016) revelam resultado semelhante ao obtido no atual estudo.

A Tabela 8 apresenta a classificação de patogenicidades das 41 amostras de origem suína. Três amostras foram classificadas sendo de alta patogenicidade, 7 de média e 31 de baixa patogenicidade. Os estudos estatísticos revelaram que existe diferença estatística ($p < 0,05$) entre todas as classificações de patogenicidade.

Tabela 7 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a distribuição das amostras de *Pasteurella*

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Alta	4	8,64 ± 0,324 ^a
Média	19	5,38 ± 0,920 ^b
Baixa	33	0,67 ± 1,573 ^c

multocida origem aviária nos grupos de patogenicidade.

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) obtidos através da inoculação de ovos embrionados de acordo com a distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* de origem suína nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Alta	3	9,030 ± 0,384 ^a
Média	7	4,870 ± 0,673 ^b
Baixa	31	1,490 ± 1,270 ^c

Kruskal-Wallis de medianas. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 observa-se que existe uma maior frequência de amostras com índices de patogenicidade baixos para ambas as espécies de origem. Foram poucas as amostras, de ambas as origens, que apresentaram um IP classificado como Alto e Médio, enquanto nos modelos experimentais de camundongos e pintos de um dia, as frequências de ocorrência de amostras nestas classificações de patogenicidade foram maiores.

Hazarika (2011) descreve em seus estudos de patogenicidade com camundongos que as amostras provenientes de suínos com as quais ele trabalhou não foram igualmente patogênicas. Gy et al. (2008) avaliaram a patogenicidade de 12 amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos em coelhos através da inoculação por via intraperitoneal em camundongos. Os isolados foram classificados em cepas patogênicas, apatogênicas e levemente patogênicas, de acordo com a mortalidade e os sinais clínicos que os animais apresentaram durante 7 dias. Pilatti e colaboradores (2016) e Emery et al. (2017) encontraram diferenças entre as frequências de lesões e os índices de patogenicidade quando compararam as espécies de origem das amostras estudadas.

4.5 Comparação dos Índices de Patogenicidade estabelecidos para *Pasteurella multocida* nos modelos animais: pintos de um dia, camundongos e ovos embrionados.

Conforme explanado anteriormente, ao longo dos últimos anos desenvolvemos no CDPA uma vasta gama de dados, correlacionando patogenicidade de cepas de *P. multocida* e suas características bioquímicas, moleculares e resistência a antimicrobianos. Este tópico trata da comparação dos três modelos experimentais estudados para o estabelecimento de estratégias mais assertivas de avaliação de patogenicidade das cepas de *P. multocida*. Ressalta-se que houve uma diferença na realização do estabelecimento dos índices de patogenicidade em camundongos apenas 94 das 97 amostras utilizadas para o estabelecimento dos índices em pintos de um dia. Três amostras classificadas como amostras de suínos não se encontravam viáveis quando os autores realizaram o estudo.

A Tabela 9 apresenta a comparação entre as diferentes classificações de patogenicidade, nos três diferentes modelos animais analisados, para amostras de origem de casos de cólera aviária.

Os resultados na Tabela 9 revelam que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos de alta, média e baixa patogenicidade dos três modelos animais, porém não houve diferença entre os modelos dentro de cada uma das classificações (alta, média e baixa) de patogenicidades.

Tabela 9 - Comparação entre as medianas obtidas para as amostras de *Pasteurella multocida* de origem avícola nos três diferentes modelos animais.

Modelo Animal	Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana \pm DP
Ovos Embrionados	Alta	4	8,64 \pm 0,324 ^a
Camundongos	Alta	16	9,46 \pm 1,061 ^a
Pintos de um dia	Alta	34	9,03 \pm 0,95 ^a
Ovos Embrionados	Média	19	5,38 \pm 0,920 ^b
Camundongos	Média	36	6,27 \pm 0,903 ^b
Pintos de um dia	Média	15	5,07 \pm 1,035 ^b
Ovos Embrionados	Baixa	33	0,67 \pm 1,573 ^c
Camundongos	Baixa	4	2,4 \pm 1,575 ^c
Pintos de um dia	Baixa	7	2,29 \pm 1,146 ^c

Teste de Tukey. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Na Tabela 10 estão descritos os resultados das classificações de patogenicidade nos três diferentes modelos animais para as cepas de *P. multocida* provenientes de suínos.

Tabela 10 - Comparação entre as medianas obtidas para as amostras de *Pasteurella multocida* de origem de suínos nos três diferentes modelos animais.

Modelo Animal	Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Ovos Embrionados	Alta	3	9,030 ± 0,384 ^a
Camundongos	Alta	3	7,83 ± 1,324 ^a
Pintos de um dia	Alta	3	10 ± 0,999 ^a
Ovos Embrionados	Média	7	4,870 ± 0,673 ^b
Camundongos	Média	11	5,74 ± 0,917 ^b
Pintos de um dia	Média	20	5,35 ± 1,267 ^b
Ovos Embrionados	Baixa	31	1,490 ± 1,270 ^c
Camundongos	Baixa	24	0 ± 0,903 ^c
Pintos de um dia	Baixa	18	1,623 ± 0,675 ^c

Teste de Tukey. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Assim como na Tabela 9, os resultados da Tabela 10 demonstram que existe diferença estatística entre os grupos de classificação de patogenicidade, porém da mesma maneira que em aves, os diferentes modelos animais não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) dentro dos três grupos de classificação de patogenicidade.

Para a comparação das lesões e reisolamento bacteriano, utilizamos os percentuais relativos, contabilizando o número de lesões possíveis, o número de animais utilizados e o número de cepas de *P. multocida* utilizadas.

Por exemplo, para camundongos foram analisadas 5 lesões para 38 amostras de *P. multocida* em 5 camundongos testados. O total de lesões possíveis é de $5 \times 38 \times 5$, o que nos dá um total de 950 lesões. O total de lesões obtidas para estas amostras foi de 264 lesões, correspondendo a 27,79% das lesões possíveis.

A Tabela 11 apresenta o percentual de lesões relativas em cada modelo experimental de acordo com a origem das amostras utilizadas, bem como suas devidas taxas de reisolamento. O teste estatístico realizado demonstrou não haver diferença estatística na proporção de lesões presentes, mesmo considerando as diferentes origens e diferentes modelos experimentais.

Tabela 11 - Relação entre o modelo experimental, origem da amostra, percentual de lesões encontradas e percentual de reisolamento da bactéria.

Modelo Animal	Origem da Amostra	% Lesões encontradas	% Reisolamento
Ovos Embrionados	Aves	36,71 ^a	42,26 ^b
Ovos Embrionados	Suínos	29,54 ^a	28,45 ^b
Camundongos	Aves	45 ^a	75,35 ^b
Camundongos	Suínos	27,79 ^a	22,63 ^b
Pintos de um dia	Aves	62,17 ^a	54,6 ^b
Pintos de um dia	Suínos	48,58 ^a	32 ^b

Teste de Múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes na mesma coluna implicam em diferença estatística ($p < 0,05$).

Outro teste estatístico realizado foi o Coeficiente de Spearman, no qual buscamos avaliar qual o grau de interferência do percentual de ocorrência de lesões no percentual de reisolamento bacteriano. Para esta correlação, obtivemos um coeficiente $r = 0,714$, o que representa uma implicação bastante forte da presença de lesões na probabilidade de reisolamento bacteriano. Embora os percentuais de reisolamento tenham sido diferentes, e expressivamente maiores para amostras oriundas de aves no modelo experimental de camundongos, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para os dados analisados.

4.6 Associação dos perfis moleculares obtidos através de PCR-RFLP e dos sorogrupos A e D de *Pasteurella multocida* com índices de patogenicidade obtidos através da inoculação em camundongos.

Tomando como base o estudo realizado por Furian et al.(2016a), foi realizada a análise comparativa dos sete diferentes perfis genéticos obtidos após a clivagem do gene *ompH* com o índice de patogenicidade (IP) das 56 amostras de *Pasteurella multocida* obtidas através do modelo experimental em camundongos. Na Tabela 12 estão descritas as medianas dos Índices de Patogenicidade obtidas para cada um dos perfis, com seus respectivos desvios padrões.

Diferente do observado por Furian e colaboradores (2016a) não foi possível observar diferença estatística ($p > 0,05$) quando relacionamos os perfis genéticos aos índices de patogenicidades correspondentes das amostras.

Furian et al., (2016a) realizaram anteriormente a identificação dos sorogrupos capsulares das amostras de *P. multocida*, através da avaliação da presença dos genes *hyaD-hyaC* e *dcfF*, que representam os sorogrupos A e D, respectivamente. Utilizando os dados obtidos por este autor, foi realizada a diferenciação das amostras oriundas unicamente de casos

de cólera aviária e a relação do sorogrupo capsular destas e os IP obtidos em camundongos por Emery et al. (2017).

Tabela 12 - Comparação da mediana dos índices de patogenicidade obtidos em camundongos para os diferentes perfis genéticos das amostras de *Pasteurella multocida* de origem aviária.

Perfis Genéticos	Nº de Amostras	Mediana ± DP
I	7	7,01 ± 1,190 ^a
II	24	6,95 ± 1,466 ^a
III	2	5,365 ± 0,247 ^a
IV	2	8,52 ± 2,093 ^a
V	10	6,255 ± 2,120 ^a
VI	5	4,64 ± 2,407 ^a
VII	6	7,505 ± 3,303 ^a

Teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes na mesma coluna representam que houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Na Tabela 13 é possível observar que aproximadamente 91% das amostras de aves pertencem ao Sorogrupo A. Além disto, observa-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os IP de amostras provenientes do grupo A em relação as amostras dos grupos D e das amostras que não foram classificadas em nenhum dos dois sorogrupos. Diversos são os estudos que sugerem que há uma correlação entre a cápsula e a virulência de *P. multocida* (CHUNG et al., 2001; ARUMUNGAN et al., 2011; DAVIES et al., 2003; DAVIES et al., 2004).

Ao analisar-se os IP obtidos em cada modelo (APÊNDICE B) para as amostras de origem avícola, pode-se verificar que somente duas amostras de índice Alto têm mesma classificação para os modelos ovos embrionados e pintos de um dia (CP 12 853 e 10), enquanto o modelo de camundongos possui 8 amostras apresentam a mesma classificação de Alto IP que em pintos de um dia (CP12 794, 32, 13, 16, 18, 21, 22 e 23).

Quando fazemos a mesma avaliação sobre as amostras provenientes de suínos, demonstradas no APÊNDICE C, observa-se que somente uma amostra (PM PI 21) pertence a classificação de IP Alto no modelo de camundongos que coincide com o IP Alto no modelo pintos de um dia. Das três amostras que obtiveram classificação de IP Alto em ovos embrionados, uma obteve níveis médios nos outros dois modelos (FII9PM), uma obteve médio no modelo pintos de um dia e baixo no modelo de camundongos (PM CII2), e a última (PROT 1924 4) não pode ser avaliada em modelo de camundongos, porém no modelo de pintos obteve classificação de IP médio.

A Tabela 13 apresenta a comparação das medianas dos índices de patogenicidades obtidos para cada grupo capsular das amostras de aves utilizadas no modelo experimental de camundongos.

Tabela 13 - Comparação dos índices de patogenicidade obtidos em camundongos, para as 56 amostras de origem aviária de *Pasteurella multocida*, de acordo com a classificação nos diferentes sorogrupos.

Sorogrupos	Nº de Amostras	Mediana \pm DP
A	51	6,715 \pm 1,905 ^a
D	3	3,740 \pm 0,849 ^b
Sem Classificação	2	5,550 \pm 5,530 ^b

Teste de Dunn's para múltiplas comparações. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

Através da obtenção dos índices utilizando o modelo experimental de ovos embrionados, foi possível a classificação das amostras de *Pasteurella multocida* em três diferentes grupos de patogenicidade (Alta, Média e Baixa).

Diferente do observado nos outros modelos experimentais, as amostras provenientes das duas diferentes origens não apresentaram diferença significativa nos IP estabelecidos em ovos embrionados.

Quando comparados os modelos experimentais e as origens bacterianas, não houve diferença estatística significativa entre os percentuais de lesões e os percentuais de reisolamento bacteriano decorrentes. Porém, ficaram evidentes as maiores frequências de reisolamento obtidas nas amostras de aves inoculadas em camundongos. Foi possível estabelecer uma correlação de 0,714 entre o percentual de ocorrência das lesões e as taxas de reisolamento bacterianas obtidas.

Não há relação entre os sete perfis genéticos do PCR-RFLP com o IP das amostras obtidas em camundongos. Não houve diferença estatística significativa entre os sete perfis quando estes foram analisados através do IP obtidos em camundongos.

Ao relacionar os IP obtidos em camundongos com os perfis capsulares que as amostras de *Pasteurella multocida* apresentam, constatou-se que as amostras pertencentes ao Sorogrupo A são mais patogênicas que as amostras do sorogrupo D ou não classificadas nestes dois tipos capsulares.

REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual. 2017. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf. Acessado em 09/02/2018 às 20:05 hs.
- AKHTAR, M. Isolation, identification and characterization of *Pasteurella multocida* from chicken and development of oil based vaccine. MS thesis of department of Microbiology and Hygiene, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/306265507_Molecular_detection_of_Pasteurella_multocida_Type_B_causing_haemorrhagic_septicemia_in_cattle_and_buffaloes_of_Bangladesh. Acessado em: 10/02/2018 às 17:08 hs.
- AMONSIN, A.; WELLEHAN, J. F. X.; LI, L. L.; LABER, J. e KAPUR, V. DNA finger printing of *Pasteurella multocida* recovered from Avian Sources. Journal of Clinical Microbiology. 2002. P. 3025-3031.
- AVISITE. Disponível em: <http://avisite.com.br/index.php?page=estatisticaseprecos&acao=exportacao>. Acessado em 17/02/2018 às 09:14 hs.
- BACK, A. Manual de Doenças das Aves. Coluna do Saber. 2004. p.25-28.
- BALAKRISHNAN, G.; MINI, M. Plasmid profile and antibiotic resistance pattern of *P. multocida* of avian origin. Indian Vetererinary Journal. 2001. v. 78. p. 783 - 786.
- BOERLIN, P. Evolution of Bacterial Virulence. In: GYLES, C. L. et al. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell Publishing. 2010. 1 ed. p. 33-50.
- BOROWSKI, S. M.; IKUTA, N.; LUNGE, V.; FONSECA, A.; MARQUES, E.; CARDOSO, M. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2002. v. 22 p. 97–103.
- BORSOI, A.; SANTIN, E; SANTOS, L. R.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella Heidelberg* strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. Poultry Science. 2009. v. 88. p. 750–758.
- BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. Journal of Biotechnology. 2000. v.83. p. 153-160.

- BOYCE, J. D. e ADLER, B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? *Current Opinion in Microbiology*. 2006. v. 9. p. 117-122.
- BOYCE, J.D.; HARPER, M.; WILKIE, I.W. e ADLER, B. *Pasteurella*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4 ed. Blackwell Publishing. 2010. p. 325-340.
- BRINGHENTI, J. D. M. Protocolo de *Pasteurella multocida* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011. Dados não publicados.
- CAMERON, R. D. A; O' BOYLE, D. O; FROST, A. J.; GORDON, A. N.; FEGAN, N. An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in a large pig herd. *Australian Veterinary Journal*. 1996. v.73. p. 27 – 29.
- CARVALHO, D; MORAES, L. B.; CHITOLINA, G. Z.; HERPICH, J. I.; OSÓRIO, F. S.; FALLAVENA, L. C. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P. Evaluation of thymic lymphocyte loss of broiler using Digital Analysis of the Lymphoid Depletion System (ADDL). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016. v. 36 n. 7. p. 652-656.
- CARTER, G. R. Studies on *Pasteurella multocida* I. A hemagglutination test for the identification os serological types. *American Journal of Veterinary Research*. 1955. v. 16. p. 481-484.
- CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Ultrastructure of cell envelopes of bactéria of the bovine rumen. *Applied Microbiology*. 1975. v. 29. p. 841-849.
- CHUNG, J. Y.; WILKIE, I.; BOYCE, J. D.; TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; GHODDUSI, M.; ADLER, B. Role of Capsule in the pathogenesis fowl cólera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and Immunity*. 2001. v.4. p. 2487-2492.
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. The Genus *Pasteurella*. In: *The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer-Verlag. 2006. v. 6 p. 1062-1090.
- DABO, S. M.; CONFER, A. W. e QUIJANO-BLAS, R. A. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotipe A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis*. 2003. v.35. p. 147-157.
- DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; BAILLIE, S.; CAFFREY, B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *Journal of Medical Microbiology*. 2003. v. 52. p. 59-67.
- DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary Microbiology*. 2004. v. 99. n. 2. p. 145-58.

- DE ANGELIS P. L.; GUNAY, N. S.; TOIDA, T.; MAO, W. J.; LINHARDT, R. J. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. *Carbohydrate research*. 2002. v. 337. n. 17. p.1547-1552.
- DE LEY, J.; MANNHEIM, W.; MUTTERS, R.; PIECHULLA, K.; TYTGAT, R.; SEGERS, P.; BISGAARD, M.; FREDERIKSEN, W.; HINZ, K. H.; VANHOUCHE, M. Inter and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1990. v. 40. p. 126-137.
- DZIVA, F.; CHRISTENSEN, H.; VAN LEENGOED, L.; MOHAN, K.; OLSEN, J. E. Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. *Veterinary Microbiology*. 2004. v. 102. p. 117-122.
- DZIVA, F.; MUHAIRWA, A.P.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 2008. v.128. p. 01-22.
- EMERY, B. D.; FURIAN, T. Q.; PILATTI, R. M.; CHITOLINA, G. Z.; BORGES, K. A.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Evaluation of the biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017. v. 37 n.10. p. 1041-1048.
- EWERS, C.; LÜBKE-BECKER, A.; BETHE, A.; KIEßLING, S.; FILTER, M.; WIELER, L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*. 2006. v.114. p.304-317.
- FASENKO, G. M.; ROBINSON, F. E.; HARDIN, R. T.; WILSON, J. L. Variability in preincubation embryonic development in domestic fowl: Effects of duration of egg storage period. *Poultry Science*. 1992. v. 71. p. 2129–2132.
- FULLER, T. E.; KENNEDY, M. J.; E LOWERY, D. E. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model usingsignature - tagged Mutagenesis. *Microbiology Pathogenic*. 2000. v.29. p. 25 – 38.
- FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; ROCHA, S. L. S.; RODRIGUES, E. E.; NASCIMENTOS, V. P.; SALLE, C. T. P. e MORAES, H. L. S. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. 2013. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.33. p.177-182.
- FURIAN, T. Q.; BORGES, K.A.; PILATTI, R. M.; ALMEIDA, C.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H. L. S. 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*. 2014. v.16. n. 2. p. 31-36.

- FURIAN, T. Q.; BORGES, K.A.; PILATTI, R. M.; ALMEIDA, C.; STRECK, A. F.; EMERY, B. D.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H. L. S. Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases*. 2016. v. 60. p. 792–798. (a)
- FURIAN, T. Q.; BORGES, K.A.; LAVINI, V.; ROCHA, S. L. S.; ALMEIDA, C.; NASCIMENTO, V. P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H. L. S. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016. v. 47. p. 210 - 216. (b)
- GANDRA, E.A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W.S.; & GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientific Technologies*. 2008. v.30. p.109-118.
- GAUTAM, R.; KUMAR, A. A.; SINGH, V. P.; SINGH, V. P.; DUTTA, T. K.; SHIVACHANDRA, S. B. Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. *Research in Veterinary Science*. 2004. v. 76. n. 3. p.179-185.
- GLISSON, J.R.; SANDHU, T. S.; HAFACRE, C.L. Pasteurellosis, Avibacteriosis, Gallibacteriosis, Reimerellosis and Pseudotuberculosis. A Laboratory Manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, AAAP. 2008. 4 ed. Cp. 4. p. 12-15. (a)
- GLISSON, J.R. Pasteurellosis and Other Respiratory Bacterial Infections. In: *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing. 2008. 12° ed. p.739-758. (b)
- GY, V.; KULCSÁR, G. e MAKRANSZKI, L. Mice Pathogenicity of *Pasteurella multocida* Strains isolated from diseased and healthy rabbits. 9° World Rabbit Congress. Verona, Italy. *Pathology and Higiene*. 2008. p. 1119-1123.
- GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F. Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms. In: GYLES, et al. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Blackwell Publishing. 2010. 4 ed. p. 3 – 14.
- HARPER, M.; BOYCE, J. D.; & ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett*. 2006. v. 265. p. 1-10.
- HAZARIKA, M. P.; BARMAN, N. N.; GERORGE, S. e SHARMA, R. K. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic pigs of Assam. *Indian Journal of Animal Research*. 2011. v. 44. p. 265-269.
- HEDDLESTON, K. L.; GALLAGHER, J. E.; REBERS, P. A. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Diseases*. 1972. v.16. p.925-936.
- HUBERMAN, Y. D.; CONDE, M; D; TERZOLO, H.R. *Pasteurella multocida*: effect of in vivo passages on pathogenicity in chicks. XXII Latin America Poultry Congress. 2011. p.1-4.

- IBRAHIM, R. S.; SAWADA, T.; EL-BALLAL, S.; SHAHATA, M.; YOSHIDA, T. e KATAOKA, Y. *Pasteurella multocida* Infection in the Chicken Embryo. *Journal of Comparative Pathology*. 1998. v.118. p.291-300.
- JABBARI, A. R.; M. ESMAELIZADEH. Molecular typing of avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR-RFLP of *ompH* gene. *Iranian Journal of Biotechnology*.2005. v.3. p. 99–103.
- KALOREY, D.R.; YUVARAJ, S.; VANJARI, S. S.; GUNJAL, P. S.; DHANAWADE, N. B.; BARBUDDHE, S. B.; BHANDARKAR, A. G. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2008. v. 31. n. 6. p. 459-65.
- KLINE, K. A.; FÄLKER, S.; DAHLBERG, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 2009. v. 5. p. 580-592.
- KORZAC, B.; CHRISTENSEN, H.; EMLER, S.; FREY, J.; KUHNERT, P. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004. v. 54. p. 1393-1399.
- KUBATZKY, K. F. *Pasteurella multocida* and Imunne Cells. *Current Topics in Microbiology e Immunology*. Springer Velag. 2012. p.1-20.
- LEE, C.W.; WILKIE, I.W.; TOWNSEND, K.M.; FROST, A. J. The demonstration of *Pasteurella multocida* in the alimentary tract of chickens after experimental oral infection. *Veterinary Microbiology*. 2000. v.72. p. 47-55.
- LIMA, D. A.; FURIAN, T. Q.; PILATTI, R. M.; SILVA, G. L.; MORGAM, R. B.; BORGES. K. A.; FORTES, F. B. B.; MORAES, H. L. S.; BRITO, B. G.; BRITO, K. C.T.; SALLE, C. T. P. Establishment of a pathogenicity index in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains inoculated in one-day-old broiler chicks. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2016. v.68, n.2, p.257-264.
- MACINNES, J. I.; BORR, J. D. The family *Pasteurellaceae*: modern approaches to taxonomy. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1990. v. 54. p. 6-11.
- MARIO, J; MIKAEL, L. G. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, Formidable Animal Pathogens. *American Society for Microbiology*. 2002. v. 68. p. 1-7.
- MIR, M. A.; THOMAS, P.; VISWAS, K. N.; GUPTA, S. K.; VERMA, J. K.; SINGH, A. P.; SINGH, V. P. Multilocus sequence typing of Indian Isolates of *Pasteurella multocida*. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*. 2011. v. 32. N. 1-2. p. 30-35.
- MOHAMED, A. M.; MOHAMED, M-W. A.; AHMED, A. I.; IBRAHIM, A. A. e AHMED, M. S. *Pasteurella multocida* in backyard chickens in Upper Egypt: incidence with PCR analysis

- for capsule type, virulence in chicken embryos and antimicrobial resistance. *Veterinaria Italiana*. 2012. v. 48. p. 77-86.
- MORAES, L. B.; OSÓRIO, F. S.; SALLE, F. O.; SOUZA, G. F.; MORAES, H. L. S.; FALLAVENA, L. C. B. ; SANTOS, L. R.; SALLE, C. T. P. Evaluation of follicular lymphoid depletion in the Bursa of Fabricius: An alternative methodology using digital image analysis and artificial neural networks. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2010. v. 30. p. 340-344.
- MUHAIRWA, A. P.; CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. 2000 . Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. *Avian Pathology*. 2000. v. 29. p.133 – 142 .
- MUTTERS, R.; MANHEIM, W.; BISGAARD, M. Taxonomy of the group. In: ADLAM, C.; RUTTER, J. M. *Pasteurella* and Pasteurellosis. Academic Press. 1989. p. 3-34.
- MUTTERS, R.; CHRISTENSEN, H. and BISGAARD, M. Genus *Pasteurella* Trevisan. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Verlag. 2003. 2 ed. p. 1887-1894.
- NASCIMENTO, V. P.; GAMA, N. M. S. Q.; CANAL, C. W. Coriza infecciosa das galinhas, Pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. In: Berchieri Júnior, A. et al. Doenças das Aves. FACTA. 2009. 2 ed. p. 512-521.
- OKAY, S.; KURT KIZILDOĞAN, A. Comparative genome analysis of five *Pasteurella multocida* strains to decipher the diversification in pathogenicity and host specialization. *Gene*. 2015. v. 567. n. 1. p. 58-72.
- OZBEY, G.; MUZ, A. Isolation of aerobic bacteria from the lungs of chickens showing respiratory disorders and confirmation of *Pasteurella multocida* by polymerase chain reaction (PCR). *Veterinarski Arhiv*. 2006. v.76. n. 3. p. 217-225.
- PANNA, S. N.; NAZIR, K. H. M. N. H.; RAHMAN, M. B.; AHAMED, S.; SAROARE, M. G.; CHAKMA, S.; KAMAL, T.; MAJUMDER, U. H.. Isolation and molecular detection of *Pasteurella multocida* Type A from naturally infected chickens, and their histopathological evaluation in artificially infected chickens in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2015. v. 2. p. 338-345.
- PATEL, H. K. Biochemical characterization, antimicrobial sensitivity, PCR-Based detection and mouse pathogenicity of *Pasteurella multocida* field isolates. (2004). Dissertação de Mestrado. Dados não publicados.
- PETER, S., MURRAY, P. R. AND FUNKE, G. TOPLEY AND WILSON'S. Microbiological and Microbial infections book. London. 2005. v. 2. 10th Ed. p. 1650 - 1658.
- PILATTI, R. M.; FURIAN, T. Q.; LIMA, D. A.; FINKLER, F.; BRITO, B. G.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Establishment of a Pathogenicity Index for One-day old Broilers to

- Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine. Brazilian Journal of Poultry Science. 2016. v.18. n.2. p. 255-260.
- RAHMAN, M. A.; SAMAD, M. A.; RAHMAN, M. B. e KABIR, M; L. acterio-pathological studies on Salmonellosis, Colibacillosis and Pasteurellosis in natural and experimental infections in Chickens. Bangladesh Journal of Veterinary Medicin. 2004. v.2. p. 01-08.
- RAJINI, R.; SESNAGIRI, R.A.; DHANALAKSHMI, K e SHARMA, B. J. R. Studies on avian pasteurellosis in Andhra Pradesh. Indian Veterinary Journal. 1995. v.72 p.115-118.
- REED, I. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. The American Journal of Hygiene. 1938. v. 27. n. 3. p. 493-497.
- REVISTA POLÍTICA AGRÍCOLA. Carta da Agricultura: O Desafio da Carne Fraca e o Mercado mundial. 2017. n. 1. p. 1-2. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163205/1/O-desafio-da-carne-frac.pdf>.
- RHODES, K. R.; RIMLER, R. B. Fowl cholerae. In: CALNECK, B. W. et al. Diseases of Poutry. Iowa State Univesity Press. 1991.p. 145-162.
- RUFFOLO, C. G.; JOST, B. H.; ADLER, B. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in Immunity. Veterinarian Microbiology.1997. v. 59. p. 123-137.
- SANT'ANNA, R.S. e CERQUEIRA, A. M. F. Apostila de aulas Práticas de Microbiologia. Curso de Nutrição. Universidade Federal Fluminense. 2007.
- SARANGI, L. N.; PRIYADARSHINI, A.; KUMAR, S.; THOMAS, P.; GUPTA, S. K.; NAGALEEKAR, V. K.; SINGH, V. P. Virulence Genotyping of *Pasteurella multocida* Isolated from Multiple Hosts from India, The Scientific World Journal. 2014. V. 2014, Article ID 814109.
- SCHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A. A.; GAUTAM, R.; SINGH, V. P.; CHAUDHURI, P. e SRIVASTAVA, S. K. PCR assay for a rapid detection of *Pasteurella multocida* serogroup A in morbid tissue materials from chickens with fowl cholera. The Veterinary Journal. 2003. v.168. p. 349-352.
- SCHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A. A.; GAUTAM, R.; JOSEPH, S.; CHAUDHURI, P.; SAXENA, M. K.; SRIVASTAVA, S. K. e SINGH, N. Detection of *Pasteurella multocida* in experimentally infecte embryonated chicken eggs by PCR assay. Indian Journal of Experimental Biology. 2006. v.44. p.321-324.
- SELLYEI, B.; IVANICS, E.; MAGYAR, T. Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the *ompH* gene. Acta Veterinaria Hungarica. 2013. v. 61. p. 1-8.

- SONGSERN, T.; VIRIYARAMPA, S.; SAE-HENG, N.; CHAMSINGH, W.; BOOTDEE, O. e PATHANASOPHON, P. *Pasteurella multocida* associated sinusites in Khaki Campbell Ducks (*Anas platyrhynchos*). Avian Diseases. 2002. v.47. p. 649-655.
- SOOD, S. e VERMA, P. C. Pathology of *Pasteurella multocida* infection on chickens. Indian Journal of Animal Research. 2006. v.40. p.15-19.
- SOUZA, G. F.; ROCHA, S. L. S.; FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; SALLE, F. O.; MORAES, L. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P. Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model. Acta Scientiae Veterinariae. 2016. v. 44. Artigo número 1347.
- SUBAAHARAN, S.; BLACKALL, L. L.; BLACKALL, P. J. Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology. 2010. v.141. n. 3-4. p. 354-361.
- TABATABEI, M.; LIU, Z.; FINUCANE, A.; PARTON, R.; COOTE, J. Protective immunity conferred by attenuated *aroA* derivatives of *Pasteurella multocida* B:2 strains in a mouse model of haemorrhagic septicemia. Infection and Immunity. 2002. v.70. p. 30-55.
- TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; LEE, C. W.; PAPADIMITRIOU, J. M.; DAWKINS, H. J. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. Journal of Clinical Microbiology. 1998. v. 36. p. 1096-1100.
- TOWNSEND, K. M.; BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. Journal of Clinical Microbiology. 2001. v. 39. p. 924-929.
- TAI, Y. C.; SHIEN, J. H.; WU, J. R.; SHIEH, H. K.; CHANG, P. C. 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. 2011. v. 23. p. 543–546.
- VERMA, S.; SHARMA, M.; KATOCH, S.; VERMA, L.; KUMAR, S.; DOGRA, V.; CHAHOTA, R.; DHAR, P.; SINGH, G. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. Veterinary Research Communications. 2013. v.37. n. 1. p. 83-89.
- WANG, Y.; ZHU, J.; LU, C.; WU, B.; LIU, D.; HANG, W.; LIU, H.; LIU, X. Evidence of circulation of an epidemic strain of *Pasteurella multocida* in Jiangsu, China by multi-locus sequence typing (MLST). Infection Genetics Evolution. 2013. v. 20. p. 34-38.
- WHITMANN, W. B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Departamento of Microbiology. University of Georgia. 1957. 7 ed. v.1. p. 395-423.

WILKIE, I. W.; GRIMES, S. E.; O'BOYLE, D.; FROST, A.J. The virulence and protective efficacy of *Pasteurella multocida* administered by different routes. *Veterinary Microbiology*. 2000. v. 72. p.57-68.

WOO, Y. K e KIM, J. H. Fowl Cholera Outbreak in Domestic Poultry and Epidemiological Properties of *Pasteurella multocida* Isolate. *The Journal of Microbiology*. 2006. v.44. p.344-353.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. Artmed. Porto Alegre. 2014. 5 ed. p. 403.

ZHAO, X.; LIU, Q.; XIAO, K.; HU, Y.; LIU, X.; LI, Y.; KONG, Q. Identification of the *crp* gene in avian *Pasteurella multocida* and evaluation of the effects of *crp* deletion on its phenotype, virulence and immunogenicity. *BMC Microbiology*. 2016. v.16 p.125.

APÊNDICE A - Distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* de origem aviária e seus respectivos índices de patogenicidade em Pintos de um dia (Pintos), Camundongos (Cam) e Ovos Embrionados (OE).

Amostras com origem de Aves							
Amostra	Pintos	Cam	OE	Amostra	Pintos	Cam	OE
720	8,06	0	0,00	PM 650	10	6,16	0,67
794	10	10	3,08	PM 651	8,13	6,94	2,69
32	8,69	10	3,33	1	2,99	6,46	2,95
33	5,07	7,39	8,51	2	7,9	7,5	5,90
800	0,17	5,16	5,90	3	4,43	6,69	2,95
801	10	6,1	0,33	4	2,29	7,19	4,41
802	8,87	6,04	5,23	5	7,8	9,46	0,00
804	4,8	3,4	4,41	6	3,31	5,79	0,00
806	6,43	7,57	1,59	7	7,44	10	5,23
809	5,46	6,5	8,77	8	7,57	7,64	5,56
812	2,17	5,81	5,03	9	8,26	6,74	3,41
817	4,88	4,72	0,00	10	9,13	7,21	8,44
818	3,27	7,38	3,87	11	10	8,86	5,38
819	5,63	7,24	3,74	12	10	5,37	0,00
821	4,69	3,17	4,41	13	10	10	0,00
822	5,17	5,01	6,87	14	7,82	6,47	0,00
823	10	6,59	5,82	15	10	7,04	0,00
824	4,39	6,55	5,21	16	10	8,35	6,31
825	1,33	3,74	6,15	17	10	7,01	2,23
826	4,56	4,64	7,95	18	10	10	0,00
828	8,6	6,07	5,08	19	8,51	5,19	2,95
850	8,44	6,96	3,08	20	7,93	1,64	0,00
851	7,69	6,36	0,00	21	10	10	0,00
852	9,18	6,67	3,54	22	10	8,19	0,00
853	8,93	7,5	9,15	23	10	9,46	0,00
PM 1218	7,69	10	3,54	24	6,93	4,4	0,00
PM 1308	6,56	5,54	1,33	27	3,95	6,05	3,54
PM 1543	7,75	6,19	4,62				
PM 649	10	6,16	4,54				

APÊNDICE B - Distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* de origem suína e seus respectivos índices de patogenicidade em Pintos de um dia (Pintos), Camundongos (Cam) e Ovos Embrionados.

Amostras com origem de Suínos							
Amostra	Pintos	Cam	OE	Amostra	Pintos	Cam	OE
2554	1,75	6,44	5,69	PROT 1924 12	5,24	3,08	5,23
903 CAM	10	-	1,33	PROT 1924 4	5,44	-	8,49
CAMBR	2,6	0,6	4,87	PROT 1989	6,42	3,89	0,67
CII4	3,6	0	3,15	25	3,12	0	1,00
FRANGOSUL	7,25	0	0,33	26	4,44	-	2,49
FII 9 PM	6,65	7,6	9,03	28	5,81	4,97	0,00
IPV 717	4,89	3,46	2,74	29	4,93	5,02	2,95
JAVALI 1354	3,5	0	2,44	30	6,77	4,78	0,33
P IV 1	2,42	5,74	3,21	31	2,1	6,69	0,00
P2PM	3,79	0,4	2,82	34	0,33	0,4	1,00
P313	1,33	0	3,54	797	2	6,28	3,21
PI05	2,5	0	1,00	798	1,17	0	0,33
PI33	2,25	0,4	0,67				
PII8	6,11	0,4	5,56				
PIII 20 PM	1,33	0	1,67				
PIII 9 PM	1,08	0,2	3,33				
PIII4	7,2	0	3,41				
PM 1/95	8,27	4,78	0,67				
PM 1621	1,42	0	1,49				
PM 1628	7,5	0	1,15				
PM 710	6,31	6,47	3,46				
PM 759	5,26	0,4	4,67				
PM 76	1,25	0	4,21				
PM CII2	4,73	0	9,23				
PM FII 14	1,33	6,15	1,33				
PM PI21	10	10	2,87				
PM43	3,89	0,2	4,05				
PMPI7	1,58	0,6	0,00				
PMPI23	1,67	7,83	3,67				

Amostras para as quais não foi possível estabelecer o IP em camundongos apresentam “ - ”, as quais não foram atribuídas nenhum valor.

APÊNDICE C. Exemplo de cálculo de Índice de Patogenicidade individual e do índice de patogenicidade da amostra.

AM	OVO	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	EH	CH	CFI	TM	Lesões	IPI	IPA
2	A														1				0	0	0	5,90
	B				1											1	1	1	3,8461	5	8,8461	
	C				1											1	1	1	3,8461	5	8,8461	

Ex: Amostra 2 - Ovo B

Embrião morreu 48 hs p.i.

$$\text{IPI} = [\text{TM} (0,769230769) \times 5] + [\text{EH} (3) \times 1] + [\text{CH} (1)] + [\text{CFI} (1)] =$$

$$\text{IPI} = 3,846153856 + 3 + 1 + 1 = 8,8461$$

$$\text{IP Amostra} = [8,846153846 + 8,846153846 + 0] / 3 [N] = 5,90$$

ANEXO A – Protocolo de aprovação do CEUA/IPVDF.

Ofício n.º 25/12 – CEUA/IPVDF

Eldorado do Sul, 20 de julho de 2012.

Senhor Pesquisador:

Com relação ao Projeto de Pesquisa – *Estabelecimento de um índice de patogenicidade para amostras de Pasteurella multocida isoladas em aves e suínos* – sob orientação do Prof. Dr. Hamilton Luis de Souza Moraes e colaborador Dr. Benito Guimarães de Brito, protocolado para análise e parecer sob nº 22/2012 pela mestrande Roberta Marmitt Pilatti, em 27 de junho de 2012, cabe referir o seguinte:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – IPVDF reuniu-se ordinariamente em 05 de julho de 2012, no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e subsequentemente emitiu **PARECER FAVORÁVEL** à pesquisa a ser desenvolvida.

É o parecer.

Atenciosamente,



FERNANDO SÉRGIO CASTILHOS KARAM
Presidente CEUA - IPVDF.

ANEXO B – Establishment of a Pathogenicity Index for One-day old Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine.



Brazilian Journal of Poultry Science

Revista Brasileira de Ciência Avícola

ISSN 1516-635X May - Jun 2016 / v.18 / n.2 / 255-260

<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0089>

Establishment of a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine

■ Author(s)

Pilatti RM¹
Furian TQ¹
Lima DA¹
Finkler F¹
Brito BG²
Salle CTP¹
Morales HLS¹

¹ Departamento de Medicina Animal, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

² Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil.

■ Mail Address

Corresponding author e-mail address
Roberta Pilatti
Av. Bento Gonçalves, 8824
91540-000. Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: (5554) 3308-6130/6138
Email: pilatti.roberta@gmail.com

■ Keywords

Fowl cholera, inoculation, *Pasteurella multocida*, pathogenicity index.

Submitted: June/2015
Approved: July/2015

ABSTRACT

Although *Pasteurella multocida* is a member of the respiratory microbiota, under some circumstances, it is a primary agent of diseases, such as fowl cholera (FC), that cause significant economic losses. Experimental inoculations can be employed to evaluate the pathogenicity of strains, but the results are usually subjective and knowledge on the pathogenesis of this agent is still limited. The objective of this study was to establish a new methodology for classifying the pathogenicity of *P. multocida* by formulating a standard index. Strains isolated from FC cases and from swine with respiratory problems were selected. One hundred μ L of a bacterial culture of each strain, containing 10^6 CFU, was inoculated in 10 one-day-old broilers. Mortality after inoculation, time of death (TD), and the presence of six macroscopic lesions were evaluated over a period of seven days post-inoculation (dpi). A Pathogenicity Index Per Bird (IPI), ranging 0 to 10, was calculated. Liver and heart fragments were collected to reisolate the bacteria. Blood was collected from the surviving birds, and an ELISA test was carried out to detect specific antibodies. The median of the pathogenicity indices, the number of lesions and the rate of bacteria re-isolation were significantly different ($p < 0.05$) among the origins of the isolates ($p < 0.05$). The pathogenicity index developed in this study allows the classification of *Pasteurella multocida* pathogenicity and may be an alternative to the pathogenicity models currently used for screening.

INTRODUCTION

Pasteurella multocida is a member of the commensal flora of the upper respiratory tract in animals. Under stress conditions, it may be involved in various respiratory syndromes as a secondary agent (Nascimento *et al.*, 2009). This microorganism also causes other diseases in livestock, such as hemorrhagic septicemia in ruminants, atrophic rhinitis in swine, and fowl cholera (FC) in poultry (Boyce *et al.*, 2004).

Despite the wide spectrum of diseases that it causes and the economic losses associated with pasteurellosis, the knowledge of the pathogenesis of this agent remains limited (Wilkie *et al.*, 2012). Studies on *Pasteurella* virulence genes (Ewers *et al.*, 2006; Furian *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2009) and in *in-vitro* transcription analyses determined that the pathogenic strain is critical because *P. multocida* is an opportunistic microorganism in vertebrates (Christensen & Bisgaard, 2006). Thus, the inoculation of animals such as rodents, chicks, and embryonated eggs is used in some studies to determine the pathogenicity of isolates (Ibrahim *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 2012; Schivachandra *et al.*, 2006). In addition, the inoculation of materials suspected to cause disease in mice with subsequent isolation of pure cultures of bacteria is a diagnostic tool for FC (Dziva *et al.*, 2008), but this method is not considered adequate to evaluate pathogenicity (Mohamed *et al.*, 2012; Schivachandra *et al.*, 2006).

Pilatti RM, Furian TQ, Lima DA,
Finkler F, Brito BG, Salle CTP, Moraes HLS



Establishment of a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine

However, studies aiming at determining the pathogenicity and classifying *P. multocida* avian and swine isolates are rare, and often subjective, regarding the presence of macroscopic lesions. The objective of this study was to establish a classification model for the pathogenicity of *P. multocida* strains isolated from poultry and pigs by inoculating one-day-old broilers.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

A total of 960 one-day-old broilers derived from 58-week-old broiler breeder not vaccinated against FC were acquired for the study. Birds were randomly assigned to groups of 10 individuals and housed in pens (30 cm of length x 55 cm of height x 35 cm of width) located in an isolation room with controlled temperature (32°C). Drinking water and commercial feed were provided *ad libitum*.

The research project complied with professional and institutional animal welfare policies and was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Veterinary Research Institute Desiderio Finamor (IPVDF), protocol number 25/2012.

Strains of *Pasteurella multocida*

Ninety-six strains of *P. multocida* were selected for the study: 54 strains previously isolated from clinical cases of FC, 40 strains isolated from pigs with respiratory signs, and two reference strains from the *American Type Culture Collection* (ATCC - American Type Culture, Manassas, VA, United States of America), numbers 15742 and 12945, isolated from turkeys and chickens, respectively. The strains were stored in sheep blood at -80 °C and reactivated according to Glisson *et al.* (2008). An aliquot of each sample was inoculated into brain heart infusion broth (BHI - Oxoid; Cambridge, United Kingdom) and incubated at 37 °C for 24 hours. After this period, the samples were plated on blood agar (BA - Oxoid; Cambridge, United Kingdom) supplemented with 5% defibrinated sheep blood and on MacConkey agar (Oxoid; Cambridge, United Kingdom). The colonies in BA were evaluated according to their morphology. Catalase and oxidase tests were performed in addition to methylene blue staining to visualize the bipolar bacterial cells. Finally, the strains were subjected to a species-specific PCR protocol to detect the gene *kmt1*, according to the protocol developed by Townsend *et al.* (1998).

Lethal Dose 50% (LD₅₀)

Five strains of *P. multocida* were selected, including the reference strains ATCC 15742 and ATCC 12945.

Bacterial cultures grown in BHI overnight at 37 °C containing 10⁸ CFU/mL were serially diluted to a final dilution of 10⁻⁹ by transferring 1 mL of the initial suspension to a tube containing 9 mL of 0.85% sterile saline. Each dilution was inoculated (0.1 mL) in 10 one-day-old broilers intraperitoneally. After a pilot project, in which 100% of birds mortality with 10⁹ CFU inoculation dose (Souza, 2010) in less than 24 hours was observed, the LD₅₀ was determined according the methodology described by Reed & Muench (1938). The LD₅₀ presented a value of approximately 10⁵ CFU.

Inoculum preparation

The inoculum preparation was standardized for all strains, according to the technique described by Borsoi *et al.* (2009) with modifications. After cultivation of each sample in BA overnight at 37 °C, a colony was selected and transferred to a tube containing 5 mL of BHI. After the cells were suspended, the solutions were homogenized and serially diluted to a final dilution of 10⁻⁹ by transferring 1 mL of the initial suspension to a tube containing 9 mL of 0.85% sterile saline. A bacterial count was performed in BA for each dilution by the drop technique (Tortora & Case, 2012; Trabulsi & Alterthum, 2008). The standard inoculum solution containing 10⁶ CFU/mL was utilized to inoculate the chicks.

Inoculation

The groups of 10 one-day old broilers were intraperitoneally inoculated with 0.1 mL of the standard inoculum solutions containing each of the 96 *P. multocida* strains. A control group of 10 broilers of the same age was also inoculated with 0.1 mL of 0.85% sterile saline by the same route. Four experimental series were performed for the inoculation of all strains. Birds were observed for a period of seven days post-inoculation (dpi).

Mortality, evaluation of the presence of macroscopic lesions and bacterial reisolation

The birds were observed every 12 h for seven consecutive days and mortality was recorded. At each visit, the dead birds were collected for necropsy and for macroscopic evaluation of the presence of the following lesions: pericarditis (PC), perihepatitis (PH), peritonitis (PT), airsacculitis (A), cellulitis (CL), and omphalitis (ONF).

Simultaneously, fragments of the liver and heart were collected from the birds and inoculated with 5 mL of BHI for bacterial reisolation, as described by Christensen & Bisgaard (2006). Blood was collected from the surviving birds by cardiac puncture 7 dpi. An indirect ELISA (IDEXX

Pilatti RM, Furlan TQ, Lima DA,
Finkler F, Brito BG, Salle CTP, Moraes HLS



Establishment of a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine

Laboratories, Westbrook, ME, United States of America) test using a commercial kit was carried out to detect antibodies specific to *P. multocida*. The birds were euthanized and then necropsied to assess the presence of macroscopic lesions and for bacterial re-isolation, as previously mentioned.

Calculation of Pathogenicity Index Per Bird (IPI)

The IPI corresponds to the pathogenicity index for each bird in each group inoculated with a strain of *P. multocida*. The calculation of the IPI was based on a study by Souza *et al.*, (2016) with modifications. A value of 10 was established as the maximum pathogenicity rate for an inoculated bird. In this index, 5 points corresponded to the time of death (TD) and its survival bonus factor (FBS). To obtain the TD value, an index of 1 (which corresponded to the maximum value assigned to a death on the first day) was divided by the number of days the birds were evaluated (7 days), resulting in a value of 0.1428, which corresponded to the FBS. Thus, every day that the birds survived discounted 0.1428 of the TD value. The remaining 5 points corresponded to scores for gross lesions (GL) present at necropsy (Souza, 2010). The GL value was determined by dividing the maximum score assigned to this indicator (5 points) by the number of lesions (6), obtaining a value of 0.833, indicating the presence of each lesion. The remaining birds did not receive were not scored for TD at the end of the seven days of observation; only the respective GL values were counted for the IPI. Therefore, the IPI was calculated according to the following equation:

$$*IPI = (TD \times 5) + PC + PH + PT + ASS + CL + ONF$$

IPI: Pathogenicity Index *Per Bird*; TD: time of death; PC: pericarditis; PH: perihepatitis; PT: peritonitis; ASS: airsacculitis; CL: cellulitis; ONF: omphalitis.

The Pathogenicity Index (IP) for each inoculated strain was calculated according to the given equation:

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

* IP: Pathogenicity Index; IPI Σ : sum of Pathogenicity Indices *Per Bird*; N: number of inoculated birds.

Statistical Analysis

Mann Whitney, Kruskal-Wallis and Dunn's non-parametric statistical tests were selected for the analysis of the results, using the statistical program GraphPad PRISM® 6 at significance level of 5% and confidence level of 95%.

RESULTS

At the end of the observation period, 75.7% of the birds inoculated with avian strains and 36.7% of those inoculated with pig isolates died. Mortality significantly higher ($p < 0.05$) in the birds inoculated with avian strains than in those challenged with pig strains isolated on 1, 2, and 4 dpi, as shown in Table 1. Similarly, the highest mortality occurred during the first 72 hours post-inoculation, regardless of the host origin.

Table 1 – Relative frequency (%) of mortality observed during seven days after inoculation of one-day-old broilers according to *P. multocida* strain origin.

Origin	Daily mortality							
	1	2	3	4	5	6	7	7*
Avian	56.1 ^a	13.6 ^a	3.0 ^a	1.6 ^a	0.5 ^a	0.2 ^a	0.7 ^a	24.3 ^a
Swine	19.3 ^b	8.3 ^b	6.3 ^a	0.7 ^b	0.7 ^a	1.2 ^a	0.2 ^a	63.3 ^b

*birds euthanized at the end of the study. Different letters in the same column indicate significant differences between groups ($p < 0.05$), Dunn's test.

All lesions were identified in at least one animal in each group inoculated with the *P. multocida* strains. Peritonitis and omphalitis were more common. Although the difference was not significant ($p > 0.05$), macroscopic lesions assessed during the *post-mortem* examination of the 10 animals inoculated with each strain were observed in fewer animals inoculated with swine strains than with avian strains (Table 2).

In the study, all strains inoculated were re-isolated from at least one of the challenged animals in each group, but the frequency of re-isolation was low, particularly from 3 dpi. However, it was also observed that the avian strains were re-isolated at a higher frequency ($p < 0.05$) than the swine strains (Table

Table 2 – Median of macroscopic lesions present in groups of 10 birds inoculated with each strain according to the origin of the strains.

Origin	N ^o	Median of macroscopic lesions \pm standard deviation					
		CL*	PC*	PH*	PT*	ASS*	ONF*
Avian	56	6,5 \pm 2,54 ^a	3,0 \pm 2,62 ^a	4,5 \pm 2,33 ^a	9,0 \pm 2,87 ^a	7,0 \pm 2,30 ^a	9,0 \pm 2,18 ^a
Swine	40	6,0 \pm 3,14 ^a	1,0 \pm 1,53 ^a	2,0 \pm 2,14 ^a	8,0 \pm 2,32 ^a	6,0 \pm 2,35 ^a	7,0 \pm 2,61 ^a

*CL: cellulitis; PC: pericarditis; PH: perihepatitis; PT: peritonitis; ASS: airsacculitis; ONF: omphalitis. Different letters in the same column represent significant differences between groups ($p < 0.05$) – Dunn's test.

Pilatti RM, Furlan TQ, Lima DA,
Finkler F, Brito BG, Salle CTP, Moraes HLS



Establishment of a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine

3). None of the serum samples collected on 7 dpi presented antibody titers in the ELISA test.

Table 3 – Relative frequency (%) of the reisolation of inoculated *Pasteurella multocida* strains and the median pathogenicity index (PI) according to the strain origin.

Origin	N° of strains	% reisolation	IP
Avian	56	54.64 ^a	7.19 ± 2.67 ^a
Swine	40	31.95 ^b	4.13 ± 2.57 ^b

Different letters in the same column represent significant difference between the groups (p<0.05) - Kruskal-Wallis test.

Based on mortality frequency and the presence of macroscopic lesions, an IP was calculated for the avian and swine strains. According to significant differences in mortality and frequency of the lesions, the median of pathogenicity indices indicated differences between the origins (p<0.05), as shown in Table 3.

The 96 strains of *P. multocida* were classified into three pathogenicity groups according to the IP, as shown in Table 4. The results show a significant difference (p<0.05) in the median IP values among the groups.

Table 4 – Median values of Pathogenicity Index (IP) obtained according to the distribution of avian and swine strains of *Pasteurella multocida* inoculated in the pathogenicity groups.

Pathogenicity Group	N. of strains	Median ± standard deviation
High (IP from 8 to 10)	37	9,13 ± 0,953 ^a
Intermediate (IP from 4 to 7)	35	5,24 ± 1,159 ^b
Low (IP from 0 to 3)	24	1,75 ± 0,837 ^c

Different letters in the same column represent a significant difference between the groups (p<0.05), Kruskal-Wallis test.

DISCUSSION

A higher mortality in birds inoculated with avian strains was observed in this study. A similar result was found in the study of Wilkie *et al.* (2000), in which chickens experimentally inoculated with a highly-pathogenic strain died within 22 to 23 hours after challenge and animals that were inoculated with a low pathogenicity strain died within 72 hours after challenge. Furthermore, the acute form of FC usually causes the rapid death of the host due to the characteristic septicemia caused by the microorganism (Boyce *et al.*, 2006).

A lower numerical frequency of macroscopic lesions was detected in the chicks inoculated with swine strains than with avian strains, but no statistical difference between strain origins was observed. The specificity of the strains related to the species of the challenged animals may explain this variation. The lesions evaluated

in the study have also been described in several papers, in which diagnostic tests were performed to confirm clinical cases of pasteurellosis (Nunes *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). However, it is only possible to correlate macroscopic findings with the etiological agent via bacteriological diagnosis because the macroscopic lesions caused by *Escherichia coli* and other bacteria are very similar to those caused by *P. multocida* (Bisgaard & Dam, 1980; Fisher *et al.*, 1998).

Differences in the daily mortality rates and the relative frequency of lesions associated with the strain origin may explain the low percentage of bacterial reisolation. The persistence of the bacteria at the site of infection, as well as their migration to other tissues and the time of death depend on the characteristics of the strain or on the host immune response (Boyce *et al.*, 2010; Wilkie *et al.*, 2012) and may influence microorganism isolation. The death caused by avian strains occurred primarily within the first 2 dpi. Although the isolation of the agent in non-selective media with a lower risk of growth of other bacteria is more likely until 2 dpi (Dziva *et al.*, 2008), *P. multocida* was isolated on all days of observation, but in decreasing numbers as the number of days after inoculation increased.

No antibody titers were detected in none of the serum samples by ELISA, possibly because the observation period was insufficient for the development of a detectable IgG immune response. Chaudhuri *et al.* (2012) evaluated the humoral immune response of mice and rabbits inoculated with *P. multocida*. Both species presented antibody titers, but the test was performed 10 days after the first inoculation. Additionally, Wilkie *et al.* (2000) inoculated chickens twice in an interval of 28 days, and observed that the serum samples collected after the first inoculation on 7 dpi presented lower titers, whereas those collected on 30 dpi had higher titers.

The median of the pathogenicity index was different between the strain origin, although literature reports that strains isolated from pigs tend to be highly virulent in birds (Glisson, 2008). However, Hazarika *et al.* (2011) noted that isolates from swine were not equally virulent when inoculated in mice. The lack of available studies on the pathogenicity of *P. multocida* *in vivo*, except for studies of inoculation in mice to determine the LD₅₀, makes it difficult to compare these data.

CONCLUSIONS

The time of death and the presence of macroscopic lesions allowed for the classification of strains for

Pilatti RM, Furian TQ, Lima DA,
Finkler F, Brito BG, Salle CTP, Moraes HLS



Establishment of a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to Pasteurella multocida Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine

different levels of pathogenicity. This methodology can be used in the future to assess the pathogenicity of *P. multocida* in diseases in which it is the primary agent, particularly in cases of respiratory syndromes from which the bacterium is commonly isolated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for funding this project (project number 578046/2008-3).

ETHICAL APPROVAL

The research project complied with professional and institutional animal welfare policies and was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Veterinary Research Institute Desiderio Finamor (IPVDF), located in Eldorado do Sul, State of Rio Grande do Sul, protocol number 25/2012.

REFERENCES

- Biggaard M, Dam A. Salpingitis in poultry. I. Prevalence, bacteriology, and possible pathogenesis in broilers. *Norddorsk Veterinaer Medicin* 1980;32(9):361-368.
- Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CT, Moraes HL, Nascimento VP. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poultry Science* 2009;88(4):750-758.
- Boyce JD, Harper M, Wilkie IW, Adler B. *Pasteurella*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, editors. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4th ed. Ames: Blackwell Publishing; 2010. p.325-346.
- Boyce JD, Adler B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? *Current Opinion in Microbiology* 2006;9(1):117-122.
- Boyce JD, Wilkie I, Harper M, Paustian ML, Kapur V, Adler B. Genomic-scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within liver tissue of chickens with fowl cholera. *Microbes and Infection* 2004;6(3):290-298.
- Chaudhuri P, Singh VP, Thamizharasan A, Lalsiamthara J. *Pasteurella multocida* P52 *aroA* mutant conferred protection to rabbits and mice against haemorrhagic septicaemia. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences* 2012; 3(1): 2278-8301.
- Christensen H, Biggaard M. The genus *Pasteurella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag; 2006. p.1062-1090.
- Dziva F, Muhairwa AP, Biggaard M, Christensen H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 2008;128(1-2):1-22.
- Ewers C, Lübke-Becker A, Bethé A, Kiebling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology* 2006;114(3-4):304-317.
- Fisher ME, Trampel DW, Griffith RW. PostDortem detection of acute septicemia in broilers. *Avian Diseases* 1998;42(3):452-461.
- Furian TQ, Borges KA, Rocha SLS, Rodrigues EE, Nascimento VPD, Salle CTP, Moraes HLS. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2013;33(2):177-182.
- Glisson JR. Pasteurellosis and other respiratory bacterial infections. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry*. 12th ed. Hoboken: Blackwell Publishing; 2008. p.739-758.
- Glisson JR, Sandhu TS, Hofacre CL. Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, rimerellosis and pseudotuberculosis. In: Dufour-Zavala L, editor. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. 5th ed. Athens: American Association of Avian Pathologists; 2008. p.12-18.
- Hazarika MP, Barman NN, Gerorge S, Sharma RK. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic pigs of Assam. *Indian Journal of Animal Research* 2011;44(4):265-269.
- Ibrahim RS, Sawada T, El-Ballal S, Shahata M, Yoshida T, Kataoka Y. *Pasteurella multocida* infection in the chicken embryo. *Journal of Comparative Pathology* 1998;118(4):291-300.
- Mohamed MA, Mohamed MW, Ahmed AI, Ibrahim AA, Ahmed MS. *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* 2012;48(1): 77-86.
- Nascimento VP, Gama NMSQ, Canal CW. Coriza infecciosa das galinhas, pasteurelose e outras infecções bacterianas. In: Berchieri JA, Silva EN, Fábio JD, Sesti L, Zuanaze MAF, editors. *Doenças das aves*. 2ª ed. Campinas: FACTA; 2009. p.512-521.
- Nunes CF, Vilela C de O, Caetano CF, Munhoz L, Raffi MB, Finger PF, Siedler B, Fisher G, Ferreira LN, Vargas GD. Ascariíase e pasteurelose em aves de criação colonial. *Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*; 2008; Gramado, Rio Grande do Sul. Brasil. p.450.
- Rahman MA, Samad MA, Rahman MB, Kabir ML. Bacterio-pathological studies on Salmonellosis, Colibacillosis and Pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 2004;2(1):1-8.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating 50 per cent endpoint. *American Journal of Hygiene* 1938;27(3):493-497.
- Shivachandra SB, Kumar AA, Gautam R, Joseph S, Chaudhuri P, Saxena MK, Srivastava SK, Singh N. Detection of *Pasteurella multocida* in experimentally infected embryonated chicken eggs by PCR assay. *Indian Journal of Experimental Biology* 2006;44(4):321-324.
- SOUZA, G. F.; ROCHA, S. L. S.; FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; SALLE, F. O.; MORAES, L. B.; MORAES, H. L. S. e SALLE, C. T. P. Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on a Animal Model. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2016. v. 44. n. 1347.
- Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q, Chen H. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(4):951-958.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Crescimento bacteriano. In: Tortora GJ, funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10ª ed. Porto Alegre: ArtDed; 2012. p.156-183.
- Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;6(4):1096-1100.
- Trabulsi LR, Alterthum F. Crescimento bacteriano. In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5ª ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p.31-36.

Pilatti RM, Furian TQ, Lima DA,
Finkler F, Brito BG, Salle CTP, Moraes HLS



Establishment of a Pathogenicity Index for One-day-old Broilers to Pasteurella multocida Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine

Wilkie IW, Grimes SE, O'Boyle D, Frost AJ. The virulence and protective efficacy for chickens of *Pasteurella multocida* administered by different routes. *Veterinary Microbiology* 2000;72(1-2):57-68.

Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2012;361: 1-22.

Zhang P, Fegan N, Fraser I, Duffy P, Bowles R, Gordon A, Ketterer PJ, Shinwari W, Blackall PJ. Molecular epidemiology of two fowl cholera outbreaks on a free-range layer farm. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2004;16(5):458-460.

ANEXO C – Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of *Pasteurella multocida*.

AVIAN DISEASES 60:792–798, 2016

Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of *Pasteurella multocida*

Thales Quedi Furian,^{AC} Karen Apellanis Borges,^A Roberta Marmitt Pilati,^A Camila Neves de Almeida,^A André Felipe Streck,^B Brunna Dias de Emery,^A Vladimir Pinheiro do Nascimento,^A Carlos Tadeu Pippi Salle,^A and Hamilton Luiz de Souza Moraes^A

^ACentro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária-CDPA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, 90460-001, Rio Grande do Sul, Brazil

^BCentro de Ciências Biológicas e da Saúde-CCBS, Universidade de Caxias do Sul-UCS, Caxias do Sul, 95070-560, Rio Grande do Sul, Brazil

Received 13 May 2016; Accepted 23 August 2016; Published ahead of print 25 August 2016

SUMMARY. In addition to being the causative agent of fowl cholera (FC), *Pasteurella multocida* is also one of the most prevalent opportunistic pathogens associated with respiratory diseases in various hosts. However, understanding of the traits that distinguish the virulent isolates that cause FC is still limited. The objective of this study was to characterize *P. multocida* isolates of Brazil by PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis in order to determine if strain-type correlates with virulence or with 22 previously studied virulence genes. The PCR-RFLP was used to classify the isolates into seven strain types, and the isolates in Profile II had a higher pathogenicity index ($P < 0.05$) than did those in Profiles I, V, and VI. The overall identity among the nucleotide sequences of the *ompH* was 89.8%. Furthermore, strains available in GenBank showed a high level of homology of the different bacterial serotypes with the groupings resulting from the PCR-RFLP. Strain Types I and II showed the highest identity with Serotypes 3 (100%) and 3-4 (99.1%), respectively. Detection of the *pfhA* gene indicated the presence of strains that are highly pathogenic. The screening detection of 22 virulence genes and inference through the decision tree models comparing the results of pathogenicity indices permitted the identification of the most highly pathogenic strains of *P. multocida*.

RESUMEN. Uso de índices moleculares de patogenicidad para identificar cepas patógenas de *Pasteurella multocida*.

Además de ser el agente causante de cólera aviar (FC), *Pasteurella multocida* es también uno de los patógenos oportunistas más prevalentes asociados con enfermedades respiratorias en diversos huéspedes. Sin embargo, el conocimiento de los rasgos que distinguen a los aislamientos virulentos que causan cólera aviar es aún limitado. El objetivo de este estudio fue caracterizar los aislamientos de *P. multocida* de Brasil mediante PCR y por el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) con el fin de determinar si el tipo de cepa correlaciona con la virulencia, o con 22 genes de virulencia estudiados previamente. El método de PCR-RFLP se utilizó para clasificar los aislados en siete tipos de cepas, y los aislados del Perfil II mostraron un índice de patogenicidad mayor ($P < 0.05$) en comparación con los aislamientos de los perfiles I, V, y VI. La identidad global entre las secuencias de nucleótidos del gene *ompH* fue 89.8%. Además, las cepas disponibles en la base de datos GenBank mostraron un alto nivel de similitud genética de los diferentes serotipos bacterianos en los grupos resultantes por el método PCR-RFLP. Las cepas tipos I y II mostraron la mayor identidad con los serotipos 3 (100%) y 3-4 (99.1%), respectivamente. La detección tamiz del gene *pfhA* indicó la presencia de cepas que son altamente patógenas. La detección tamiz de 22 genes de virulencia y la inferencia a través de los modelos de árboles de decisión que compararon los resultados de los índices de patogenicidad permitió la identificación de las cepas de más alta patogenicidad de *P. multocida*.

Key words: pasteurellosis, *ompH* gene, serotypes, virulence genes, pathogenicity indices, pathogenicity-associated markers

Abbreviations: D = Simpson diversity index; FC = fowl cholera; OMPS = outer membrane proteins; PCR-RFLP = restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments; T = typeability

Of the hundreds of species of bacteria that occupy the oral and nasal cavities of animals, those belonging to the family *Pasteurellaceae* are among the most prevalent opportunistic pathogens, particularly among those involved in respiratory diseases (56). In addition, they can be the primary causative agents of important diseases such as hemorrhagic septicemia in ruminants, atrophic rhinitis in swine, and fowl cholera (FC), all of which are caused by the bacterium *Pasteurella multocida* (28,55).

FC has a worldwide distribution (26) and is currently becoming a major concern in free-range systems for commercial laying hens (45,46,57). *Pasteurella multocida* is a nonmotile, non-spore-forming, gram-negative bacillus (26). Its strains are classified into five types or serogroups (A, B, D, E, and F) based on their capsular antigens (14) and into 16 serotypes based on the distribution of somatic antigens (31). Although biotyping through the use of biochemical tests remains a key factor in the identification of the

causative agent (22), molecular methods have gained more emphasis in typing *P. multocida* isolates as a result of the inherent limitations of biotyping tests based on carbohydrate fermentation and of serologic tests (22). Moreover, biotyping and serologic methods generally do not exhibit sufficient discriminatory power for the analysis of distinct outbreaks that are caused by the same *P. multocida* clone (15). Of the available molecular methods, studies (1,33,44,50) based on the structure of the *ompH* gene and lipopolysaccharides of *P. multocida* using the restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) technique are main examples. Between 20% and 30% of the genes present in bacteria encode outer membrane proteins (OMPs) (36), and these proteins are subject to selective pressure and display considerable heterogeneity that can be used to assess the diversity and epidemiologic relatedness of strains (20). *OmpH* is the main OMP present in the outer membrane of *P. multocida*, and genetic alignments of the 16 existing bacterial serotypes show considerable

^CCorresponding author. E-mail: thales.furian@ufrgs.br

length and nucleotide sequence variation in two regions that encode two large loops in the protein's secondary structure (30).

Despite the broad spectrum of diseases it causes and the economic impact of these diseases, understanding of the pathogenesis of FC and other pasteurelloses is extremely limited, especially compared to the information available from descriptive studies of other gram-negative bacteria (55). For example, a greater understanding of the initial site of colonization that precedes systemic dissemination and an understanding of how the bacterium penetrates the mucosal surfaces of the respiratory and digestive tracts before entering the bloodstream are needed (29). The main reason for this gap in knowledge is that genetic analyses of *P. multocida* have only advanced in the last 15 yr. Most of the studies conducted prior to this period were descriptive studies in which the genes and proteins associated with a genotype were not identified or characterized (55). The first fully sequenced genome of this bacterium, a strain of avian origin designated PM70, was not available until 2001 (38). The genome analysis helped identify a number of virulence genes, including genes encoding filamentous hemagglutinins and genes involved in iron transport and metabolism (9). Similarly, studies (8,17) involving the cloning and sequencing of genes involved in capsular biosynthesis helped identify regions that are specific for each serogroup of *P. multocida*.

The primary structures associated with virulence in *P. multocida* are the capsule and lipopolysaccharide. However, several other factors may also be related to the agent's ability to infect a host (28,55). Examples include genes that encode structures such as fimbriae and adhesins (*ptfA*, *pfbA*, *hsf-1*, *tadD*) or outer membrane proteins (*ompH*, *ompA*, *oma87*; *plpB*) (30). Several studies (4,18,24,39) have also identified and characterized genes encoding enzymes of bacterial metabolism, such as sialidases (*nanH*, *nanB*), dismutases (*sodA*, *sodC*), proteins associated with iron transport and metabolism (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *fur*), and dermonecrotic exotoxins (*toxA*).

Pasteurella multocida is apparently a part of the normal flora of the respiratory tract of healthy animals and can be maintained in the oropharynx region of immunocompetent hosts for long periods without causing disease (43). However, many commensals can become pathogens, an event that most often occurs as a result of changes in the pathogenicity of the microorganism (37). The definition or classification of strains based on their pathogenicity is still limited because many genes may encode virulence factors that have not yet been characterized in experimental studies (9). Furthermore, no single virulence factor or mechanism has been directly correlated with the incidence or severity of FC (55). Similarly, there are no known serologic or biochemical characteristics or genetic markers that can differentiate between highly virulent and less virulent strains of *P. multocida* from fowl (52).

Although there are several examples of strains that exhibit different degrees of virulence due to the absence of various factors (37), the response of the microorganism during the infectious process can only be analyzed in animal studies (9). Examples include studies that have compared the *in vitro* and *in vivo* transcriptional responses of the same strain of *P. multocida* after isolation of the bacterium from the liver and blood of experimentally infected chickens (10,11). Another possible method for determining the pathogenicity of isolates is inoculation of chicks or embryonated eggs followed by evaluation of the time of death and disease pathology (40,42). The inoculation of suspect materials into mice to

obtain pure bacterial cultures presents another possibility for diagnosing FC (22).

The objective of this study was to characterize *P. multocida* isolates of Brazil by PCR-RFLP in order to determine if strain type correlates with virulence or 22 previously studied virulence genes.

MATERIALS AND METHODS

***Pasteurella multocida* isolates.** In total, 56 isolates of *P. multocida* from clinical cases of FC in southern Brazil between 1993 and 2011 were selected. All isolates were from flocks and breeder farms that have never used vaccines against FC, and they had been stored in whole sheep blood at -80°C . The isolates were recovered in brain-heart infusion broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, U.K.), a nonselective enrichment medium, and were incubated at 37°C for 24 hr. After this period, they were plated on blood agar (Oxoid Ltd.) supplemented with 5% defibrinated sheep blood and onto MacConkey agar (Oxoid Ltd.). The material was incubated at 37°C for 24 hr. Colony morphologies on blood agar were then evaluated. Wright staining was used to observe the bipolar characteristics of the bacterial cells (41). Finally, catalase and oxidase tests and other biochemical tests were performed using the BacTray III system (Laborclin Ltda, Pinhais, PR, Brazil). One colony of each strain was selected for bacterial DNA extraction using the commercial NucleoSpin Tissue[®] kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). All isolates were classified as belonging to the genus *Pasteurella* and species *multocida* using the PCR protocol established by Townsend *et al.* (49), which is based on the amplification of a 460-bp fragment of the *kmt* gene.

PCR-RFLP. The PCR-RFLP protocol for amplifying a 1000-bp fragment of the *ompH* gene was based on the work of Selyei *et al.* (44), with modifications. The forward (5'-GCGTTTCATTCAAAGCATCTC-3') and reverse (5'-ATGACCGCGTAACGACITTC-3') primers designed by Antony *et al.* (1) were selected. The PCR reaction mixture consisted of 2.5 μl of 10 \times concentrate buffer (Promega, Madison, WI), 2.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate (Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brazil), 10 pM of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1.5 U of GoTaq[®] Hot Start Polymerase (Promega), 25 mM of MgCl₂ (Promega), 13.45 μl of ultrapure water, and 2 μl of DNA. Amplification reactions were performed in a Swift[™] MaxPro Thermal Cycler (Esco Micro Pte. Ltd., Singapore) using the following parameters: initial denaturation at 94°C followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 56°C for 60 sec, extension at 72°C for 60 sec, and a final extension at 72°C for 10 min. Electrophoresis of amplified products was performed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The amplicons were cleaved with 10 U of *DraI* or *HindIII* enzymes (Invitrogen), as recommended in the manufacturer's protocol. The enzymes were selected based on a virtual restriction map generated using the program Restriction Mapper (version 3.0, available at <http://www.restrictionmapper.org>). After resolution of the products on 2% agarose gels, the PCR product bands were analyzed using an ultraviolet light transilluminator Pharmacia LKB MacroVue[®] (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and the migration of each fragment was compared to that of a 100-bp molecular weight marker (Invitrogen). The isolates were grouped based on their cleavage pattern profiles. The results were photodocumented using AlphaDigidoc[®] Pro system (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and assessed for their typeability (T) and their discriminatory power using the Simpson diversity index (D) based on the formulas described by Hunter and Gaston (32).

Sequencing. For each profile, a group of randomly selected isolates was sequenced to precisely determine the restriction sites. Each isolate was sequenced in triplicate. Initially, the amplicons were purified using the commercial QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The DNA was subjected to agarose gel electrophoresis on a

Table 1. Molecular typing of 56 Brazilian fowl cholera isolates of *Pasteurella multocida* results in seven strain types.^A

Strain type	Fragments, bp	Absolute and relative frequency,	
		No.	(%) <i>n</i> = 56
I	131, 216, 314, 337	7	(12.5)
II	314, 317, 337	24	(42.8)
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)

^APCR-RFLP analysis of the *ompH* gene digested with the restriction endonucleases *DraI* (strain Types I, II, V, VI, and VII) and *HindIII* (strain Types III and IV).

2% gel, stained with ethidium bromide, and quantified using the molecular weight marker Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen) as a standard and the commercial kit Quant-iT™ dsDNA HS Assay (Invitrogen) read on a QUBIT™ fluorometer (Invitrogen). Subsequently, 50 ng of template DNA, 4.5 pM of the specific primer, and ultrapure water were added to a 0.5-ml microcentrifuge tube for a final volume of 6 µl. The samples were sequenced using an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer® automatic sequencer (Applied Biosystems, Norwalk, CT) equipped with 50-cm capillaries and POP-6™ polymer (Applied Biosystems). The DNA templates (50 ng) were labeled using 2.5 pM forward primer, 2.5 pM reverse primer, and 3 µl of BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) reagent, for a final reaction volume of 10 µl. The labeling reactions were performed in the GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) using the following conditions: an initial denaturation step at 96 C for 3 min followed by 25 cycles of 96 C for 10 sec, 55 C for 5 sec, and 60 C for 4 min. Once labeled, the samples were purified by precipitation using 75% isopropanol and washed with 60% ethanol. The precipitated products were diluted in 10 µl of Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems), denatured at 95 C for 5 min, cooled on ice for 5 min, and electroinjected into an automated sequencer. Sequencing data were collected using the program Data Collection v. 1.0.1 (Applied Biosystems) with the parameters Dye Set "Z," Mobility File "DT3100POP6[BDv3]v1.mob," BioLIMS Project "3100_Project1," Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfV_100," and Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz." The sequence quality of the forward and reverse primer reactions was analyzed based on the electropherograms generated and contigs built by the program Seqman Pro in the DNASTar Lasergene® package (available at <http://www.dnastar.com/t-seqmanpro.aspx>). After generating consensus sequences, multiple alignments of the data were generated using the Clustal W method with sequences of the *P. multocida* serotypes available in GenBank (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under the following accession numbers: 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, and AY864815. Phylogenetic inference was performed using the neighbor-joining algorithm in the program Molecular Evolutionary Genetics Analysis® (MEGA, version 6:06, available at <http://www.megasoftware.net>). In addition, a similarity threshold to differentiate between all possible pairs of the nearest sequences (pairwise distance) was generated using the same program.

Identification of pathogenicity-associated genetic markers. The aim of this step was to identify which of 22 previously surveyed genes of virulence or putative virulence loci (*ompH*, *oma87*, *pfpB*, *psl*, *ompA*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *fur*, *nanB*, *sodA*, *nanH*, *pfpA*, *pfpA*, *hsf-1*, *tadD*, *waxA*, *pmpHAS*, *hyaD-hyaC*, *bebD*, and *dcbf*) in 56 isolates of *P. multocida* (25) could be associated with levels of pathogenicity. The pathogenicity indices that were calculated on a scale of 0 to 10 by Pilati

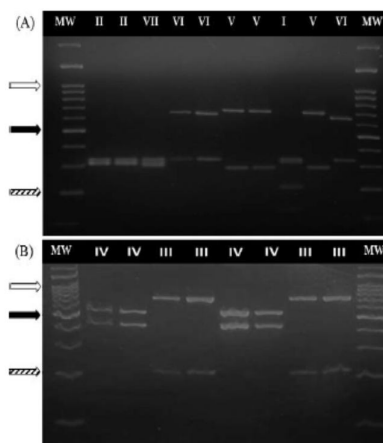


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of restriction fragments on a 2% gel stained with ethidium bromide showing cleavage strain types for the *ompH* gene amplification product obtained from *Pasteurella multocida* after digestion with the enzyme *DraI* (A) and *HindIII* (B). Legend: MW = molecular weight marker (100 bp); dashed arrow = 200-bp fragment; solid arrow = 500-bp fragment; white arrow = 1000-bp fragment.

et al. (42) based on the experimental inoculation of chicks were used. In that preliminary study, 56 *P. multocida* isolates were divided into three pathogenicity groups. The high-pathogenicity group displays pathogenicity indices ranging from 8 to 10, the average-pathogenicity group displays indices ranging from 4 to 7, and the low-pathogenicity group displays indices ranging from 0 to 3 (42). A conditional inference method using classification trees for each of the 22 genes associated with virulence was employed using the *cree* function in the *party* package in R (The R Project for Statistical Computing®).

Statistical analysis. A descriptive statistical analysis was employed to determine the frequency of PCR-RFLP profiles. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare the means of the pathogenicity indices of isolates based on their PCR-RFLP profiles. A decision tree inference method in R (*cree* function; *party* package) was used to determine possible pathogenicity-associated genetic markers. The SPSS and R (The R Project for Statistical Computing®) were used for the analyses, adopting a reference significance level of 5%.

RESULTS

PCR-RFLP. The PCR-RFLP analysis of the *ompH* gene separated the 56 isolates into seven strain types, of which Profiles II and V were the most frequent, as described in Table 1.

The Profiles I, II, V, VI, and VII were created following digestion with the restriction endonuclease *DraI* (Fig. 1), whereas strain Types III and IV were not cleaved by *DraI*, but were distinguishable following cleavage with *HindIII* (Fig. 1). The protocol showed 100% T for the samples. The T value for a method is the percentage of typeable or positive bacterial isolates based on a clear interpretation of the results (2). Thus, all the isolates could be placed in one of seven strain types identified by this method. However, the Simpson diversity index or D of the PCR-RFLP analysis of the *ompH* gene was 0.76. The D value indicates the probability that two randomly selected isolates in a test population belong to different groups or types (2). Thus, it is interpreted that in 76% of cases they are classified into different strains types. According to Hunter and Gaston (32), indexes greater than 0.9

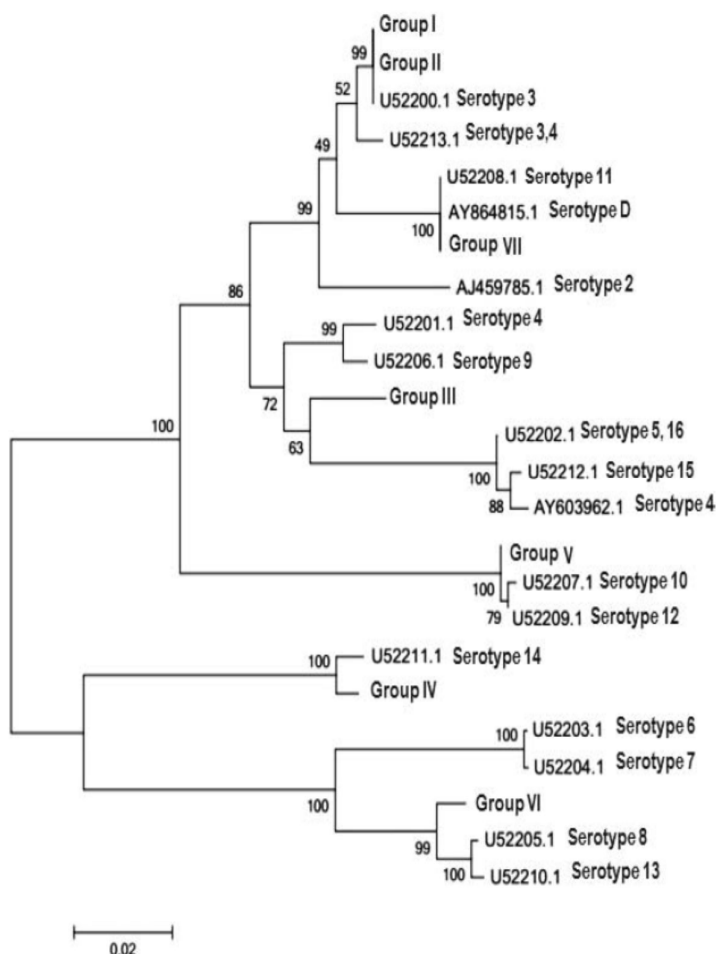


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationship between the *ompH* nucleotide gene sequences of the PCR-RFLP strain types and *Pasteurella multocida* strains of different serotypes.

are considered desirable. The lowest rate observed in the study is the result of the majority distribution of strains in Profile II, which had a negative influence on the value obtained, despite the diversity of strain types generated (32).

There was not a significant association ($P > 0.05$) of the PCR-RFLP molecular profiles of the 56 isolates with the previously identified A and D serogroups of *P. multocida* (25). Therefore, the strain types were evenly distributed throughout the two serotypes. The profiles were related to the isolates' pathogenicity indices, derived from experimental inoculations in chicks (42). The isolates in strain Type II presented the highest pathogenicity index (8.97 ± 0.98), which was significantly higher ($P < 0.05$) than the indices for Profiles I (6.06 ± 3.47), V (4.04 ± 1.37), and VI (5.81 ± 1.4) but not significantly different ($P > 0.05$) from the pathogenicity indices for Profiles III (7.53 ± 1.38), IV (6.88 ± 1.48), and VII (6.5 ± 2.62).

Sequencing. Three isolates from each PCR-RFLP strain type were randomly selected for sequencing. In the case of Types III and IV, there were only two isolates for these types, and both isolates were

sequenced. The overall identity among the sequences analyzed was 89.8%. Similarly, comparisons of the nucleotide sequence similarities for the *ompH* gene of *P. multocida* strains available in GenBank showed a high degree of homology between the PCR-RFLP-determined profiles and the different bacterial serotypes. The constructed phylogenetic tree indicates that Profiles I and II, which were prevalent in the strain classification, show the highest identity with Serotypes 3 (100%) and 3-4 (99.1%). Profile III shows the highest identity with Serotypes 9 (97.4%) and 4 (96.8%), Profile IV with Serotype 14 (99.3%), Profile V with Serotypes 10 (99.8%) and 12 (99.7%), Profile VI with Serotypes 8 (98.5%) and 13 (98.4%), and Profile VII with Serotype 11 (100%; Fig. 2).

Identification of pathogenicity-associated genetic markers. The genes *pfhA* and *ompA* were shown to be important indicators of a strain's pathogenicity. The absence of the *pfhA* gene indicates that the isolates have an intermediate or low degree of pathogenicity ($P < 0.001$). In turn, the presence of this gene correlates primarily with isolates that are highly pathogenic and secondarily with isolates that have an intermediate degree of pathogenicity ($P < 0.001$). Cases in

which *pfhA* is present and *ompA* is absent result in the absolute observation of highly pathogenic isolates ($P < 0.035$).

DISCUSSION

Selecting the *ompH* gene for the development of the PCR-RFLP analysis provided an effective basis for identifying polymorphisms among *P. multocida* isolates; on the basis of these polymorphisms, 100% of the isolates could be grouped into seven distinct restriction patterns. Other studies (7,33,44) that have used the *ompH* gene to analyze and discriminate between isolates have reported similar results. In the study by Sellyei *et al.* (44), upon which the current protocol was based, eight profiles were identified among 60 isolates using *DraI*, *HindIII*, and *PvuII*.

The availability of typing techniques has contributed to determination of the population structures and to taxonomic revisions of *P. multocida* and its related species (16,22). In addition to the traditional method for typing this microorganism through serotyping (14,31), which presents a low discriminatory power and is laborious (15,22,26), the use of DNA-based typing methods has been a major advance in typing *P. multocida* (5). However, parts of these useful molecular methods share a limitation. The comparisons across laboratories and time are difficult or impossible to perform (5). The diversity of profiles observed in the study, including the number variation of profiles using an adapted PCR-RFLP protocol in distinct regions (44), demonstrates the restriction of the comparative analysis and highlights the diversity of *P. multocida* avian isolates.

Although most molecular typing studies available in the literature, including those for *P. multocida*, have been limited to descriptions of the number of profiles generated and the frequency of isolates in each strain type, determining the discriminatory power of molecular typing analysis is important for comparison of the different protocols that have been developed (32). The ease of use of the Simpson diversity index (D) gives it certain advantages, especially for laboratories that are not national reference centers (5). In this study, the D index for PCR-RFLP analysis of the *ompH* gene was similar to that reported by Borowski (6). Thus, if two isolates in the target population are randomly selected, the index indicates that in 76% of cases these isolates will be classified into different profiles or strain types. According to Hunter and Gaston (32), indexes greater than 0.9 are considered desirable. The lower rate observed in this study is the result of the majority of the isolates being classified into strain Type II, which negatively influenced the D value obtained, despite the diversity of the profiles generated.

There was no significant association ($P > 0.05$) of the PCR-RFLP profiles with Serogroups A and D of the bacterium. Dziva *et al.* (21) also found no relationship between the patterns generated in random amplified polymorphic DNA molecular typing and *P. multocida* serogroups in a study conducted in Africa, nor did El Tayeb *et al.* (23) in the United States. Such associations are described in studies (19,53) that analyzed the electrophoretic migration profile of the OmpH protein, considering the variants with different electrophoretic mobilities as individual markers for different *P. multocida* clones (19). This relationship has also been cited for other outer membrane proteins such as OmpA. Recently, Vougidou *et al.* (54) found no correlation among capsule types, the profiles generated based on *ompA*, and the presence or absence of the gene *toxA*. In contrast, strains representative of one of the clusters generated were exclusively associated with Serogroup D in the same study (54).

Although the isolates that make up strain Type II in the PCR-RFLP analysis presented the highest pathogenicity index among the seven molecular profiles, the value only differed significantly from the pathogenicity indices of three other profiles. Jabbari and Esmaelizadeh (33) found considerable genetic diversity among the isolates they analyzed and correlated the profiles with chronic or acute forms of FC, although the exact relationship between the PCR-RFLP profiles and phenotypic characteristics such as pathogenicity was not determined. Likewise, Davies *et al.* (20) found no correlation between OmpH protein migration profiles for isolates of porcine and the presence of disease, such as pneumonia, in the animals analyzed. Thus, molecular typing test results are only the first step toward a more detailed study of the pathogenic properties of subgroups of microorganisms (13). Although some profiles in this study were implicated as containing more virulent isolates, in the future, typing results should be interpreted in conjunction with clinical and epidemiologic contexts (51).

A comparison of the similarity of the *ompH* nucleotide gene sequences showed a high level of homology between the strain types defined by PCR-RFLP analysis and the different bacterial serotypes. Likewise, the high overall identity among the sequences confirms the conserved nature of *ompH*, as was also emphasized by Singh *et al.* (47) in a similar study. In the present study, a high level of homology was also found between Profiles I and II, which were the most prevalent in this study, and Serotypes 3 and 3-4, which are known to cause the majority of FC cases (16).

The majority of pathogens employ toxicity or invasiveness to cause disease (3). In this study, the *pfhA* gene, followed by the *ompA* gene, were important indicators of the degree of pathogenesis. The *pfhA* gene encodes filamentous hemagglutinins that are important in bacterial invasion and colonization of the host's upper respiratory tract (48). Ewers *et al.* (24) also observed a significant association between the presence of *pfhA* and the occurrence of pasteurellosis in cattle, although the analysis was conducted using host information obtained after the bacteria were isolated from clinically ill and healthy animals. Moreover, Tatum *et al.* (48) and Guo *et al.* (27) demonstrated that inactivation of the *pfhA* gene attenuates the virulence of strains when administered intranasally into turkeys and chickens. Furthermore, Johnson *et al.* (34) recently performed a genomic analysis and reported that the PfhB2 protein, encoded by *pfhA*, showed a percent similarity of less than 90% when the P1059 and X73 strains, which are virulent in avian species, were compared to the avirulent strain PM70.

In this study, the presence of *pfhA* and the absence of *ompA* resulted in the observation of 100% of strains with high degrees of pathogenicity. Although *ompA* influences the relationship between *P. multocida* and its host, two alleles of the gene that produce different levels of adhesion and invasion of *P. multocida* have been described (35). In the future, identification based on sequencing of *ompA* alleles will be necessary.

Experimental animal infection is still considered the gold standard for evaluating the virulence potential of *P. multocida* isolates (52). However, since the creation in Brazil of the National Council for the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA]) in 2008 and the Ethics Committee on the Use of Animals (Comissões de Ética no Uso de Animais [CEUA]) in educational and research institutions, alternative techniques that could replace the use of animals have been evaluated (12). The screening used to detect the 22 virulence genes and the inferences made based on the decision

tree models and on comparison of the formulated pathogenicity indices helped identify pathogenic strains of *P. multocida* without the need for animal inoculations.

REFERENCES

1. Antony, X., G. Nair, V. Jayaprakasan, M. Mini, and T. Aravindakshan. Nucleic acid based differentiation of *Pasteurella multocida* serotypes. *Internet J. Vet. Med.* 2:85–89. 2007.
2. Barth, A. L., L. S. Nunes, and L. F. Baethgen. Tipagem molecular de microrganismos. In: *Métodos diagnósticos: consulta rápida*, 2nd ed. J. L. M. F. Soares, D. D. Rosa, V. R. S. Leite, and A. C. Pasqualotto, eds. ARTMED, Porto Alegre, Brazil. pp. 662–666. 2012.
3. Becciro, A., M. Tomás, and G. Bou. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.* 26:185–230. 2013.
4. Bethe, A., L. H. Wieler, H. J. Selbitz, and C. Ewers. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Vet. Microbiol.* 139:97–105. 2009.
5. Blackall, P. J., and J. K. Mifflin. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathol.* 29:271–287. 2000.
6. Borowski, S. M. Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no estado do Rio Grande do Sul. Doctoral Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. 2001.
7. Borowski, S. M., N. Ikuta, V. Lunge, A. Fonseca, E. Marques, and M. Cardoso. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. *Pesq. Vet. Bras.* 22:97–103. 2002.
8. Boyce, J. D., J. Y. Chung, and B. Adler. Genetic organization of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B2). *Vet. Microbiol.* 72:121–134. 2000.
9. Boyce, J. D., T. Seemann, B. Adler, and M. Harper. Pathogenomics of *Pasteurella multocida*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:23–38. 2012.
10. Boyce, J. D., I. Wilkie, M. Harper, M. L. Paustian, V. Kapur, and B. Adler. Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. *Infect. Immun.* 70:6871–6879. 2002.
11. Boyce, J. D., I. Wilkie, M. Harper, M. L. Paustian, V. Kapur, and B. Adler. Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within liver tissue of chickens with fowl cholera. *Microbes Infect.* 6:290–298. 2004.
12. 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. Seção 1, 1. 2008.
13. Bruisten, S. M., and L. Schouls. Molecular typing and clustering analysis as a tool for epidemiology of infectious diseases. In: *Modern infectious disease epidemiology*. A. Krämer, M. Kretzschmar, and K. Krickeberg, eds. Springer-Verlag, New York. pp. 117–141. 2009.
14. Carter, G. R. Studies on *Pasteurella multocida* I.A haemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.* 16:481–484. 1955.
15. Christensen, H., and M. Bisgaard. The genus *Pasteurella*. In: *The prokaryotes*, 3rd ed. M. Dworkin, ed. Springer-Verlag, New York. pp. 1062–1090. 2006.
16. Christensen, J. P., and M. Bisgaard. 2000. Fowl cholera. In: *Poultry diseases*, 6th ed. M. Pattison, P. F. McMullin, J. M. Bradbury, and D. J. Alexander, eds. Elsevier Science, Philadelphia. pp. 149–154. 2008.
17. Chung, J. Y., Y. Zhang, and B. Adler. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol. Lett.* 166:289–296. 1998.
18. Cox, A. J., M. L. Hunt, J. D. Boyce, and B. Adler. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microb. Pathog.* 34:287–296. 2003.
19. Davies, R. L., R. Maccorquodale, and B. Caffrey. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. *Vet. Microbiol.* 91:169–182. 2003.
20. Davies, R. L., R. Maccorquodale, and S. Reilly. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.* 99:145–158. 2004.
21. Dziva, F., H. Christensen, J. E. Olsen, and K. Mohan. Random amplification of polymorphic DNA and phenotypic typing of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 82:361–372. 2001.
22. Dziva, F., A. P. Muhairwa, M. Bisgaard, and H. Christensen. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 128:1–22. 2008.
23. El Tayeb, A. B., T. Y. Morishita, and E. J. Angrick. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:121–125. 2004.
24. Ewers, C., A. Lübke-Becker, A. Bethe, S. Kiebling, M. Filter, and L. H. Wieler. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.* 114:304–317. 2006.
25. Furian, T. Q., K. A. Borges, V. Laviniki, S. L. Da Silveira Rocha, C. N. De Almeida, V. P. Do Nascimento, C. T. Salle, and H. L. De Souza Moraes. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Braz. J. Microbiol.* 47:210–216. 2016.
26. Glisson, J. R. Pasteurellosis and others respiratory bacterial infection. In: *Diseases of poultry*, 12th ed. Y. M. Saif, ed. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 739–758. 2008.
27. Guo, D., Y. Sun, A. Zhang, J. Liu, Y. Lu, P. Liu, D. Yuan, Q. Jiang, C. Si, and L. Qu. Construction and virulence of filamentous hemagglutinin protein B1 mutant of *Pasteurella multocida* in chickens. *J. Integr. Agric.* 13:2268–2275. 2014.
28. Harper, M., J. D. Boyce, and B. Adler. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:1–10. 2006.
29. Harper, M., J. D. Boyce, and B. Adler. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:39–51. 2012.
30. Hatfaludi, T., K. Al-Hasani, J. D. Boyce, and B. Adler. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 144:1–17. 2010.
31. Heddleston, K. L., J. E. Gallagher, and P. A. Rebers. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* 16:925–936. 1972.
32. Hunter, P. R., and M. A. Gaston. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465–2466. 1988.
33. Jabbari, A. R., and M. Esmalzaizadeh. Molecular typing of avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR-RFLP of *ompH* gene. *Iranian J. Biotechnol.* 3:99–103. 2005.
34. Johnson, T. J., J. E. Abrahante, S. S. Hunter, M. Hauglund, F. M. Tatum, S. K. Maheswaran, and R. E. Briggs. Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity. *BMC Microbiol.* 13:106. 2013.
35. Katoch, S., M. Sharma, R. D. Patil, S. Kumar, and S. Verma. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*. *Vet. Res. Commun.* 38:183–191. 2014.
36. Koebnik, R., K. P. Locher, and P. Van Gelder. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37:239–253. 2000.
37. Kubatzky, K. F. *Pasteurella multocida* and immune cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:53–72. 2012.
38. May, B. J., Q. Zhang, L. L. Li, M. L. Paustian, T. S. Whitam, and V. Kapur. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:3460–3465. 2001.
39. Mizan, S., A. Henk, A. Stallings, M. Maier, and M. D. Lee. Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* 182:6874–6883. 2000.
40. Mohamed, M. A., M. W. Mohamed, A. I. Ahmed, A. A. Ibrahim, and M. S. Ahmed. *Pasteurella multocida* in backyard chickens in upper Egypt: incidence with polymerase chain reaction analysis for capsule type,

- virulence in chicken embryos and antimicrobial resistance. *Vet. Ital.* 48:77–86. 2012.
41. Oliveira, S. J. Guia bacteriológico prático-microbiologia, 3rd ed. ULBRA, Canoas, Brazil. 2012.
42. Pilatti, R. M., T. Q. Furian, D. A. Lima, F. Finkler, B. G. Brito, C. T. P. Salle, and H. L. S. Moraes. Establishment of a pathogenicity index for one-day-old broilers to *Pasteurella multocida* strains isolated from clinical cases in poultry and swine. *Braz. J. Poult. Sci.* 18:255–260. 2016.
43. Samuel, M. D., R. G. Botzler, and G. A. Wobeser. Avian cholera. In: *Infectious diseases of wild diseases of poultry*, 12th ed. N. J. Thomas, D. B. Hunter, eds. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 239–269. 2007.
44. Sellyei, B., E. Ivanics, and T. Magyar. Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the *ompH* gene. *Acta Vet. Hung.* 61:1–8. 2013.
45. Singh, R., P. J. Blackall, B. Remington, and C. Tumi. Studies on the presence and persistence of *Pasteurella multocida* serovars and genotypes in fowl cholera outbreaks. *Avian Pathol.* 42:581–585. 2013.
46. Singh, R., B. Remington, P. Blackall, and C. Tumi. Epidemiology of fowl cholera in free range broilers. *Avian Dis.* 58:124–128. 2014.
47. Singh, R., K. Tewari, N. Packiriswamy, S. Marla, and D. Rao. Molecular characterization and computational analysis of the major outer membrane protein (*ompH*) gene of *Pasteurella multocida* P52. *Vet. Arch.* 81:211–222. 2011.
48. Tatum, F. M., A. G. Yersin, and R. E. Briggs. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* *fhxB2* mutant in turkeys. *Microb. Pathog.* 39:9–17. 2005.
49. Townsend, K. M., A. J. Frost, C. W. Lee, J. M. Papadimitriou, and H. J. Dawkins. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:1096–1100. 1998.
50. Tsai, Y. C., J. H. Shien, J. R. Wu, H. K. Shieh, and P. C. Chang. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of the genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23:543–546. 2011.
51. Van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoom, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, and M. Struelens. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13(Suppl. 3):1–46. 2007.
52. Varga, Z., D. V. Volokhov, L. Stipkovits, A. Thuma, B. Sellyei, and T. Magyar. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from geese. *Vet. Microbiol.* 163:149–156. 2013.
53. Vasfi Marandi, M., J. Harel, and K. R. Mittal. Identification by monoclonal antibodies of serotype D strains of *Pasteurella multocida* representing various geographic origins and host species. *J. Med. Microbiol.* 46:603–610. 1997.
54. Vougidou, C., V. Sandalakis, A. Psaroulaki, V. Siarkou, E. Petridou, and L. Ekateriniadou. Distribution of the *ompA*-types among ruminant and swine pneumonic strains of *Pasteurella multocida* exhibiting various *cap-locus* and *toxA* patterns. *Microbiol. Res.* 174:1–8. 2015.
55. Wilkie, I. W., M. Harper, J. D. Boyce, and B. Adler. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:1–22. 2012.
56. Wilson, B. A., and M. Ho. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26:631–655. 2013.
57. Zhang, P., N. Fegan, I. Fraser, P. Duffy, R. E. Bowles, A. Gordon, P. J. Ketterer, W. Shinwari, and P. J. Blackall. Molecular epidemiology of two fowl cholera outbreaks on a free-range chicken layer farm. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:458–460. 2004.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq]) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [MAPA]) for their financial support for this project.

ANEXO D – Evaluation of the biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity.

Pesq. Vet. Bras. 37(10):1041-1048, outubro 2017

Evaluation of the biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity¹

Brunna D. de Emery^{2*}, Thales Q. Furian², Roberta M. Pilatti², Gabriela Z. Chitolina², Karen A. Borges², Carlos T.P. Salle² and Hamilton L.S. Moraes²

ABSTRACT. Emery B.D., Furian T.Q., Pilatti R.M., Chitolina G.Z., Borges K.A., Salle C.T.P. & Moraes H.L.S. 2017. **Evaluation of the biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs and its relationship with pathogenicity.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(10):1041-1048. 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: brunnadeemery@hotmail.com

Pasteurella multocida is a Gram-negative bacillus that causes economic losses due to the development of respiratory diseases in several animal species. Among the mechanisms of virulence, the formation of biofilms is an important factor for bacterial survival in hostile environments. Studies of biofilm formation by *P. multocida* are needed because *P. multocida* is an important pathogen involved in respiratory infections. However, in contrast to other microorganisms, few studies of biofilm formation have examined *P. multocida*. Studies comparing the pathogenicity of microbial strains as a function of their biofilm production capacity are also rare. Consequently, the aim of this study was to evaluate the biofilm formation capacity of 94 *P. multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and from swine lungs on polystyrene plates. The associations of the biofilm formation capacity with the pathogenicity index (PI) *in vivo* and with the presence of four genes (screened by PCR) of the *tad* locus (*tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG*), described as adhesion markers, were also determined. Strains from both animal origins were able to form biofilms. However, most of the specimens (52.13%) were classified as weak producers, and more than 40% of the strains of *P. multocida* (40.42%) did not produce biofilms. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the degree of biofilm production between the two sources of isolation. Of the analyzed strains, 56.52% contained all four genes (*tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG*). The PI arithmetic mean of the strains classified as non-biofilm producers was significantly different ($p < 0.05$) from the PI of moderate-producer strains. The PI of specimens classified as weak biofilm producers also differed significantly ($p < 0.05$) from that of the moderate-producer strains. The results indicate that even though the *P. multocida* strains isolated from cases of fowl cholera and swine lungs formed biofilms on polystyrene surfaces, adhesion was usually weak. The genes *tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG* were not significantly associated ($p > 0.05$) with the production of biofilms and with the origin of a given strain. Finally, low virulence strains may suggest a higher biofilm formation capacity on polystyrene plates.

INDEX TERMS: *Pasteurella multocida*, *tad* locus, biofilm, pathogenicity.

¹ Received on July 28, 2016.

Accepted for publication on December 23, 2016.

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

RESUMO. [Avaliação da capacidade de formação de biofilme por cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de cólera aviária e de pulmões de suínos e sua relação com a patogenicidade.] *Pasteurella multocida* é um bacilo Gram negativo que ocasiona perdas econômicas, geralmente associadas a doenças respiratórias em diversas

espécies animais. Entre os mecanismos de virulência existentes, a formação de biofilmes demonstra ser um importante fator para a proteção e para a sobrevivência bacteriana em ambientes hostis. Estudos relacionados à formação de biofilmes por *P. multocida* são necessários, uma vez que este é um importante patógeno envolvido em infecções respiratórias. Entretanto, ainda são poucos os estudos desenvolvidos nesta área, quando comparados com aqueles envolvendo outros microrganismos. Também são os raros os estudos que comparam a patogenicidade das cepas com a sua capacidade de produção de biofilme. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno de 94 cepas de *P. multocida* isoladas de casos de cólera aviária e de pulmões de suínos, associando-se com o índice de patogenicidade (IP) *in vivo* e com a presença de quatro genes do locus *tad* (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*), descritos como marcadores de adesão e pesquisados através de PCR. As cepas de ambas as origens foram capazes de formar biofilme. Contudo, a maioria dos exemplares (52,12%) foi classificada como fracamente produtora e mais de 40% das cepas de *P. multocida* (40,42%) não produziram biofilme. Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) quanto ao grau de produção de biofilme entre as duas origens de isolamento. 56,52% das cepas analisadas apresentaram os quatro genes (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*) concomitantemente. O IP médio das cepas classificadas como não produtoras de biofilme apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao IP das cepas moderadamente produtoras. Os exemplares classificados como fracamente produtores de biofilme diferiram significativamente ($p < 0,05$) do grupo de cepas moderadamente produtoras. Os resultados obtidos indicaram que, apesar de as cepas de *P. multocida* isoladas de casos de cólera aviária e do pulmão de suínos apresentarem capacidade de formar biofilme em superfícies de poliestireno, a adesão ocorreu geralmente de forma fraca. Os genes *tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*, pertencentes ao locus *tad*, não apresentaram associação significativa com a produção de biofilme e nem com a origem de isolamento da cepa. Por fim, observou-se que as cepas de menor patogenicidade apresentaram uma maior capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Pasteurella multocida*, locus *tad*, biofilme, patogenicidade

INTRODUCTION

Pasteurella multocida is a Gram-negative bacillus that causes economic losses associated with numerous respiratory diseases in poultry farms (Moraes et al. 2014) and, in some cases, the processing of animal products (Ribeiro et al. 2012). *P. multocida* causes fowl cholera (FC) as well as progressive atrophic rhinitis, pneumonia and serositis in swine, hemorrhagic septicemia in cattle and pasteurellosis in rabbits (Boyce et al. 2010, Ferreira et al. 2012, Wilkie et al. 2012). Sporadic cases of infections in humans are usually associated with scratches and bites caused by dogs and cats (Hunt Gerardo et al. 2001, Kawashima et al. 2010). These infections can range from chronic to fatal sepsis, as is generally observed in the cases of FC and hemorrhagic septicemia (Wilkie et al. 2012).

Among various virulence mechanisms, the formation of biofilms is an important factor for bacterial survival and protection in hostile environments, such as in tissue or on an inert surface, with exposure to light, desiccation, osmotic pressure and to pH and temperature variations (Costerton et al. 1995, 1999, Sutherland 1997). A biofilm is a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced polymeric extracellular matrix that is attached to a biotic or abiotic surface (Costerton et al. 1995, Donlan & Costerton 2002, Hall-Stoodley & Stoodley 2009). Infections involving sessile microorganisms are often chronic and difficult to treat (Costerton et al. 1999). The microbe's ability to escape the host immune system under these conditions and to resist high antimicrobial concentrations facilitates the persistence of the microorganism (Lemon et al. 2008, Silva et al. 2014).

The National Institutes of Health (NIH) estimates that 75% of infections in humans result from the formation and persistence of biofilms (Richards & Melander 2009). Considering the extensive role of biofilms in human infection, it is probable that biofilms are also related to a variety of infections in animals (Clutterbuck et al. 2007, Freeman et al. 2009). The major bacteria with known potential for biofilm formation include representatives of the genera *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Salmonella* and *E. coli* (Freeman et al. 2009, Rajagopal et al. 2013). Recent studies suggest that *P. multocida* can also form biofilms, including in swine lungs (Ross 2006, Rajagopal et al. 2013, Moraes et al. 2014). However, such studies are rare compared with those involving other organisms. In addition, biofilm formation is usually not compared to the pathogenicity of a given isolate.

The main structures associated with virulence that have been identified in *P. multocida* strains are the capsule and lipopolysaccharide (LPS). However, other factors are known to be important virulence markers in *P. multocida* (Wilkie et al. 2012). These factors include genes encoding outer membrane proteins (*ompH*, *oma87*), genes related to iron metabolism (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*) and those encoding fimbriae and adhesins (*ptfA*, *pflA*, *tad*) (Ewers et al. 2006, Corney et al. 2007, Hatfaludi et al. 2010). The genes of the *tad* locus have been described as bacterial adhesion markers. Homologous regions of the biosynthesis locus play an important role in biofilm formation, colonization and pathogenesis of other *Pasteurellaceae* members and some Gram-negative bacteria (Tomich et al. 2007, Moraes et al. 2014).

Because *P. multocida* is an important pathogen involved in respiratory infections, studies of biofilm formation are necessary. Biofilms can be an important virulence factor for bacterial survival in the host (Rajagopal et al. 2013). Consequently, the aim of this study was to evaluate the biofilm formation capacity of *P. multocida* isolates *in vitro* and the relationship of biofilm formation capacity with pathogenicity, as well to detect genes of the *tad* locus in these strains.

MATERIALS AND METHODS

***Pasteurella multocida* samples.** For this study, we selected 94 strains isolated from clinical cases of FC (n=55) and from swine lungs of healthy animals (n=39) at slaughter. All strains were stored in total sheep blood at a temperature of -80°C. Reactivation

and preliminary tests for the confirmation of the purity of *Pasteurella multocida* samples were performed as described by Glisson et al. (2008) and Furian et al. (2013).

The strains were reactivated in brain heart infusion (*Brain Heart Infusion* - BHI - Oxoid; Basingstoke, Hampshire, UK) broth and incubated at 37°C for 24 hours. After this period, the strains were plated on blood agar (Oxoid) supplemented with 5% defibrinated sheep's blood and on MacConkey agar (Oxoid), a culture medium in which *P. multocida* growth does not occur. The strains were then incubated again at 37°C for 24 hours. Subsequently, the morphology of the colonies present on blood agar was evaluated. Giemsa staining was used to observe the bipolar characteristics of the bacterial cells. Finally, evaluation of catalase and oxidase, in addition to biochemical tests using the BacTray III system (Laborclin; Pinhais, Paraná, Brazil), were performed. One colony was selected for DNA extraction using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). A PCR protocol for species-specific amplification of a 460-bp fragment of the *kmt* gene was performed, as described by Townsend et al. (1998). Reference strains of *P. multocida* (ATCC 15742, ATCC 12945) were selected as positive controls.

Evaluation of biofilm formation capacity at 37°C. The methodology used was adapted from the studies of Stepanovic et al. (2000), Silva et al. (2014) and Borges (2015).

Initially, the strains were plated on TSA agar without glucose (Trypticase Soy Agar, Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 24 hours. Subsequently, a colony of each sample was inoculated in TSB broth without glucose (Trypticase Soy Broth - TSB - Difco; Detroit, USA) and incubated at 37°C for 24 hours. After this period, the culture was diluted in TSB broth to achieve a concentration corresponding to 1 McFarland scale unit (Probac; São Paulo, Brazil), which indicates a concentration of approximately 3×10^8 CFU/mL. Then, 200 µL of the bacterial suspension from each sample was inoculated in triplicate in polystyrene 96-well flat-bottomed plates (Kasvi, Curitiba, PR, Brazil), including the strains selected as positive controls, and the plates were incubated at 37°C for 24 hours. One strain of *Salmonella enteritidis* and one strain of *Escherichia coli* in our lab previously classified as strong biofilm producers were selected as positive controls. The negative control was TSB broth without glucose, which was added to three wells of each plate.

After incubation, the bacterial suspensions were removed, and the plates were washed three times with 250 µL of sterile 0.9% sodium chloride solution to remove planktonic cells. Thereafter, 200 µL of methanol (Nuclear; Diadema, SP, Brazil) was added to fix the adherent bacterial cells. The contents of the wells were removed after 15 minutes, and the plates were dried at room temperature. A 200-µL aliquot of 2% Hucker crystal violet solution was added to stain the fixed cells. After 5 minutes, the plates were washed in water and dried again at room temperature. To perform the reading, 200 µL of 33% glacial acetic acid (Nuclear) was added, and the absorbance was measured 1 hour later by an ELISA reader at 550nm (Biotek; Winooski, USA). The absorbance value of each strain (DO_3) was obtained by calculating the arithmetic mean of the triplicate wells. The cutoff point was defined as three deviations above the absorbance mean of the negative control (DO_0). To determine biofilm formation capacity, the following classification was used: non-adherent ($DO_3 \leq DO_0$), weakly adherent ($DO_0 < DO_3 \leq 2 \times DO_0$), moderately adherent ($2 \times DO_0 < DO_3 \leq 4 \times DO_0$) and strongly adherent ($4 \times DO_0 < DO_3$).

Strain pathogenicity index (PI). The pathogenicity indices (PIs) of the 94 strains were associated with biofilm formation capacity at 37°C. The PIs were previously established by Pilatti et al. (2016). In this preliminary study, the strains were classified into three groups of pathogenicity (high, intermediate, low) on a scale

from 0 to 10, calculated from the experimental inoculation of one-day-old chicks. The high-pathogenicity group comprised strains with PIs ranging from 8 to 10, the intermediate-pathogenicity group had PIs between 4 and 7, and the low-pathogenicity group included strains with indices from 0 to 3 (Pilatti et al. 2016).

DNA extraction and detection of *tad* locus genes. An aliquot of 1 mL of BHI broth inoculated overnight with each strain was used for DNA extraction using the commercial extraction kit NucleoSpin (Macherey Nagel; Düren, Germany). The extracted DNA was stored at -2 °C until analysis by PCR to detect the four genes of the *tad* locus (*tadB*, *tadD*, *tadE* e *tadG*). The oligonucleotides used were obtained from previous studies (Table 1)^a

To amplify the *tadD* gene, we used the PCR protocol described by Furian et al. (2016). The amplification of the *tadB*, *tadE* and *tadG* genes was adapted from the protocol described by Moraes et al. (2014). The reaction mix was composed of 2. µL of 10X buffer, 0. µL of dNTPs (1 mM - Ludwig Biotec; Alvorada, Rio Grande do Sul, Brazil), 0. µL of primers (2 pmol - Invitrogen; Carlsbad, CA, USs), 1.5 U of GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega; Madison, Wisconsin, USs), 1.2 µL of MgCl₂ (2 mM - Promega) and 17.5 µL of ultra-pure water.

The amplification reactions were performed in a Swift MaxPro thermocycler (Esco Technologies; Singapore) under the following conditions: initial denaturation at 9 °C for 5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 9 °C (30 seconds), annealing at 5 °C (30 seconds) and extension at 7 °C (60 seconds), and a final extension step at 7 °C (10 minutes). Electrophoresis of the amplified products was performed in agarose gels stained with 1.5% ethidium bromide. The gels were photo-documented (Alpha Innotech; San Leandro, California, USs) and then interpreted. The standard strains *P. multocida* ATCC 12945 and *Avibacterium gallinarum* ATCC 13360 were selected as positive and negative controls, respectively.

Statistical analysis. Descriptive statistical analysis was used to determine the absolute and relative frequency of virulence genes as well as the grouping of the samples according their biofilm formation capacity. The non-parametric chi-square (χ^2) and Fisher's exact tests were used to analyze the distribution of the strains classified in each biofilm group. The nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare the means of the pathogenicity indices of strains with their biofilm formation capacity. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS) was used for statistical analysis, adopting as a reference a significance level of 5% and a confidence level of 95%.

RESULTS

The *Pasteurella multocida* strains isolated from both sources formed biofilms on polystyrene plates, as shown in Table 2. However, most of the specimens (52.13%) were classified as weakly adherent, and more than 40% of the strains (40.42%) did not produce biofilms. Although only swine

Table 1. Sequences of *tad* gene oligonucleotides and the respective amplicon sizes

Gene	Primers sequence (5'- 3')	Amplicon	Reference
<i>tadB</i>	TTGCCTAATTGTCCCCTTA TGGAAGTTAGGCCAATACCG	150 bp	Moraes et al. (2014)
<i>tadD</i>	TCTACCCATTCTCAGCAAGGC ATCAATTCGGGCATTACCC	416 bp	Tang et al. (2009)
<i>tadE</i>	TGGATTCTGCCAAGAGAAC ATCTCTCTACGGGGAGTCG	195 bp	Moraes et al. (2014)
<i>tadG</i>	AACTGCCCAATTGTTCTCG CCTTCTGGTTGGACTTCTGC	224 bp	Moraes et al. (2014)

strains were classified as moderate producers (Table 2), there was no significant difference ($p > 0.05$) in the degree of biofilm production between the two isolate sources".

All PCR protocols were specific for the detection of *tad* locus genes. Of the 94 strains of *P. multocida*, 56.52% possessed all four genes analyzed (*tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG*).

Analysis of the frequencies of the genes according to the origin of isolation (Table 3) revealed that more than 80% of the avian and swine strains were positive for *tadB* and 100% were positive for *tadE* and *tadG*, regardless of source. In contrast, the *tadD* gene was detected in 50.91% of avian strains and 82.05% of the strains isolated from swine".

Based on the relative frequencies of the four genes studied, the relationship between the presence of these genes and bacterial adhesion was established. Of the avian strains positive for the four genes screened, 61.53% were classified as biofilm producers, including a strong producer strain. Among the strains isolated from swine, 57.68% of the strains that were positive for the four genes were classified as biofilm producers, including three classified as moderate producers. However, the absence of individual *tadB* and *tadD* genes was not significantly associated ($p > 0.05$) with the variation in the biofilm formation capacity of the *P. multocida* strains.

Following the evaluation of biofilm formation and grouping of the samples, the analyzed strains were compared to their respective PIs (Table 4), which were previously obtained by an *in vivo* study (Pilatti et al. 2016). The mean PI of the *P. multocida* strains classified as non-biofilm producers differed significantly ($p < 0.05$) from the mean PI of moderate biofilm producer strains (Fig 1). Similarly, the PIs of specimens classified as weak biofilm producers differed significantly from PIs of the moderate producer strains. However, there was no significant difference ($p > 0.05$) between the PIs of the strains that did not produce biofilms and the PIs of weak biofilm producers (Fig 1).

DISCUSSION

Several pathogenic bacteria present in animals produce biofilms (Costerton et al. 1999). However, studies of the production of these structures by *Pasteurella multocida* strains are rare (Olson et al. 2002, Romanò et al. 2013).

Table 2. Classification of the 94 strains of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine according to the degree of biofilm production at 37°C

Biofilm production classification	Avian (n=55)	Swine (n=39)
non-biofilm producers	25 (45.45%)	13 (33.33%)
weak biofilm producers	29 (52.73%)	20 (51.28%)
moderate biofilm producers	0 (0.00%)	6 (15.39%)
strong biofilm producers	1 (1.82%)	0 (0.00%)
all biofilm producers	30 (54.54%)	26 (66.67%)

Table 3. Absolute and relative frequency (%) of the four virulence genes (*tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG*) according to the origin of the *Pasteurella multocida* strain

Origin	Virulence genes			
	<i>tadB</i>	<i>tadD</i>	<i>tadE</i>	<i>tadG</i>
Avian (n=55)	46 (83.64)	28 (50.91)	55 (100%)	55 (100%)
Swine (n=39)	34 (87.18)	32 (82.05)	39 (100%)	39 (100%)

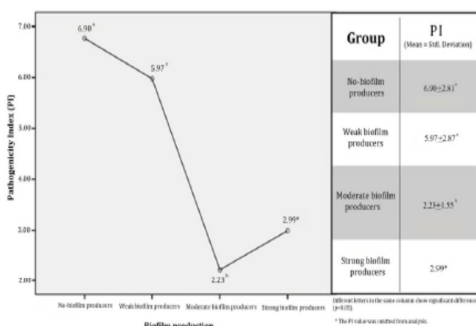
Table 4. Classification of the samples according to their biofilm formation, pathogenicity index and pathogenicity group

Sample	Host	Biofilm production classification	Pathogenicity index (PI)*	Groups of Pathogenicity*
1	Chicken	Non-biofilm producer	3.27	Low
2	Chicken	Non-biofilm producer	6.93	Intermediate
3	Chicken	Non-biofilm producer	5.07	Intermediate
4	Chicken	Non-biofilm producer	4.8	Intermediate
5	Chicken	Non-biofilm producer	6.43	Intermediate
6	Chicken	Non-biofilm producer	5.46	Intermediate
7	Chicken	Non-biofilm producer	4.88	Intermediate
8	Chicken	Non-biofilm producer	6.56	Intermediate
9	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
10	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
11	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
12	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
13	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
14	Chicken	Non-biofilm producer	8.51	High
15	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
16	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
17	Chicken	Non-biofilm producer	8.69	High
18	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
19	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
20	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
21	Chicken	Non-biofilm producer	8.6	High
22	Chicken	Non-biofilm producer	9.18	High
23	Chicken	Non-biofilm producer	8.93	High
24	Chicken	Non-biofilm producer	10	High
25	Chicken	Non-biofilm producer	7.75	High
26	Chicken	Weak biofilm producer	2.29	Low
27	Chicken	Weak biofilm producer	3.31	Low
28	Chicken	Weak biofilm producer	2.17	Low
29	Chicken	Weak biofilm producer	1.33	Low
30	Chicken	Weak biofilm producer	4.43	Intermediate
31	Chicken	Weak biofilm producer	7.44	Intermediate
32	Chicken	Weak biofilm producer	3.95	Intermediate
33	Chicken	Weak biofilm producer	5.63	Intermediate
34	Chicken	Weak biofilm producer	4.69	Intermediate
35	Chicken	Weak biofilm producer	5.17	Intermediate
36	Chicken	Weak biofilm producer	4.39	Intermediate
37	Chicken	Weak biofilm producer	4.56	Intermediate
38	Chicken	Weak biofilm producer	7.36	Intermediate
39	Chicken	Weak biofilm producer	7.9	High
40	Chicken	Weak biofilm producer	7.8	High
41	Chicken	Weak biofilm producer	7.57	High
42	Chicken	Weak biofilm producer	8.26	High
43	Chicken	Weak biofilm producer	9.13	High
44	Chicken	Weak biofilm producer	10	High
45	Chicken	Weak biofilm producer	7.82	High
46	Chicken	Weak biofilm producer	10	High
47	Chicken	Weak biofilm producer	7.93	High
48	Chicken	Weak biofilm producer	10	High
49	Chicken	Weak biofilm producer	8.06	High
50	Chicken	Weak biofilm producer	8.87	High
51	Chicken	Weak biofilm producer	8.44	High
52	Chicken	Weak biofilm producer	7.69	High
53	Chicken	Weak biofilm producer	8.13	High
54	Chicken	Weak biofilm producer	10	High
55	Chicken	Strong biofilm producer	2.99	Low
56	Swine	Non-biofilm producer	0.33	Low
57	Swine	Non-biofilm producer	2.42	Low
58	Swine	Non-biofilm producer	2.25	Low
59	Swine	Non-biofilm producer	5.81	Intermediate
60	Swine	Non-biofilm producer	4.93	Intermediate
61	Swine	Non-biofilm producer	5.44	Intermediate
62	Swine	Non-biofilm producer	5.24	Intermediate
63	Swine	Non-biofilm producer	3.79	Intermediate
64	Swine	Non-biofilm producer	4.73	Intermediate
65	Swine	Non-biofilm producer	3.5	Intermediate
66	Swine	Non-biofilm producer	3.98	Intermediate

(Cont.) Table 4. Classification of the samples according to their biofilm formation, pathogenicity index and pathogenicity group

Sample	Host	Biofilm production classification	Pathogenicity index (PI)*	Groups of Pathogenicity*
67	Swine	Non-biofilm producer	3.6	Intermediate
68	Swine	Non-biofilm producer	6.11	Intermediate
69	Swine	Weak biofilm producer	3.12	Low
70	Swine	Weak biofilm producer	2.1	Low
71	Swine	Weak biofilm producer	2	Low
72	Swine	Weak biofilm producer	1.17	Low
73	Swine	Weak biofilm producer	1.75	Low
74	Swine	Weak biofilm producer	2.6	Low
75	Swine	Weak biofilm producer	1.33	Low
76	Swine	Weak biofilm producer	1.33	Low
77	Swine	Weak biofilm producer	1.67	Low
78	Swine	Weak biofilm producer	6.77	Intermediate
79	Swine	Weak biofilm producer	4.89	Intermediate
80	Swine	Weak biofilm producer	7.5	Intermediate
81	Swine	Weak biofilm producer	6.31	Intermediate
82	Swine	Weak biofilm producer	6.65	Intermediate
83	Swine	Weak biofilm producer	6.42	Intermediate
84	Swine	Weak biofilm producer	7.2	Intermediate
85	Swine	Weak biofilm producer	7.25	Intermediate
86	Swine	Weak biofilm producer	10	High
87	Swine	Weak biofilm producer	10	High
88	Swine	Weak biofilm producer	8.27	High
89	Swine	Moderate biofilm producer	1.25	Low
90	Swine	Moderate biofilm producer	1.33	Low
91	Swine	Moderate biofilm producer	1.42	Low
92	Swine	Moderate biofilm producer	2.5	Low
93	Swine	Moderate biofilm producer	1.58	Low
94	Swine	Moderate biofilm producer	5.26	Intermediate

*Pillatti et al. (2016)

Fig.1. Distribution of *Pasteurella multocida* strains of avian and swine origin according to their biofilm formation and to their pathogenicity index (PI) calculated from the experimental inoculation of chicks.

Biofilm-forming bacteria adhere to practically all surfaces *in vitro* under suitable conditions. Among these conditions, the restriction of nutrients, such as TSB broth without glucose (used in the present study), is an important condition for the formation of biofilms (Christensen et al. 1982, Dewanti & Wong 1995). Furthermore, Olson et al. (2002) determined that TSB broth supplementation with 2% of fetal bovine serum and incubation in 10% CO₂ are necessary conditions for *P. multocida* biofilm formation. Such conditions should be evaluated in future studies for comparison with the results obtained here.

Several substrates, both hydrophobic and hydrophilic, are used to stimulate the fixation of bacteria *in vitro* (Rajagopal et al. 2013). The polystyrene selected in this study is an inert material often used to assess biofilm formation capacity in bacterial species (Silva et al. 2014, Borges 2015, Narayanan et al. 2016, Salimena et al. 2016). A recent study by Rajagopal et al. (2013) also reported the adhering ability of *P. multocida* to an inert surface formed by bentonite clay.

The potential of *P. multocida* strains to form biofilms was observed in this study by growing the organism under nutrient restriction and on polystyrene plates. Regardless of origin, the strains analyzed exhibited low levels of adhesion without strong biofilm production, as described for other bacteria, such as *Salmonella* spp. (Marquezini 2015) and *Pseudomonas aeruginosa* (Hassett et al. 2009). However, *P. multocida* did exhibit the ability to form biofilms. Thus, research on the adhesion capacity of microorganisms is essential because *P. multocida* is an important respiratory pathogen and the production of these structures could contribute to the increased virulence of the organism (Rajagopal et al. 2013).

It is also important to note that there are different ways to evaluate the production of biofilms, including the congo red agar method, bioluminescent assay, air-liquid interface, microscopy examination, among others (Freeman et al. 1989, Donlan et al. 2001, Hassan et al. 2011, Cabarkapa et al. 2015, Karched et al. 2015). A clear picture of attachment cannot be obtained without considering the effects of the substratum, conditioning films forming on the substratum, hydrodynamics of the aqueous medium, characteristics of the medium and various properties of the cell surface (Donlan 2002). Thus, the use of different quantitative or qualitative assessment methods may present different results, especially with *P. multocida*, and should be compared in the future.

The degree of biofilm formation was compared with the PI obtained for the same strain, which can be considered a measure of the *in vivo* pathogenicity of the isolate (Pillatti et al. 2016). Pathogenicity is related to the characteristics of a microorganism that are involved in the capacity to cause infection, whereas virulence determines the level of disease caused by a specific pathogenic microorganism (Kubatzky 2012). However, the low biofilm formation capacity of the pathogenic *P. multocida* strains examined in this study suggests that virulence factors are predominant in the process of infection. For example, the main *P. multocida* surface components, lipopolysaccharide and capsule, play important roles in the resistance to phagocytosis and the inhibition of complement and the activity of antimicrobial peptides (Wilkie et al. 2012). In addition, other virulence factors are involved in the survival of the microorganism in the infected host, and pathogenic bacteria generally have multiple adhesins to distinct cell types (Harper et al. 2006, Kline et al. 2009, Wilson & Ho 2013).

Biofilm formation may also function as a survival mechanism under adverse conditions in less virulent strains or with *P. multocida* involved in secondary infections. For example, *P. multocida* can colonize swine lungs in the form of biofilms, causing lesions that are generally difficult to tre-

at because of the blockade of antimicrobial action and the monocyte phagocytic system (Donlan & Costerton 2002, Moraes et al. 2014). Despite these results, the correlation of biofilm formation capacity with the pathogenicity of a given strain should be further evaluated in future studies with a larger number of strains classified as strong biofilm producers. This relationship was not possible to evaluate statistically in this study due to the presence of only a single strong biofilm producing strain.

In addition, the lesions evaluated through the experimental inoculation (Pilatti et al. 2016) involve mechanisms and virulence factors previously surveyed (Furian et al. 2016) that are not directly related to biofilm formation. For example, the widespread petechiae on serosal and epicardial surfaces of the inoculated animals were an indication of the consumptive coagulopathy common to endotoxemia (Boyce et al. 2010). Likewise, death after inoculation is probably associated with a massive bacteremia and endotoxic shock with the lysis and subsequent release of endotoxins that damage the host tissues (Harper et al. 2006). On the other hand, bacteria in biofilms can be viewed as biogenic habitat formers at a microscale (Flemming et al. 2016) and they are not directly related to these lesions. By generating a matrix, bacteria in biofilms create a physically distinct habitat that provides shelter, promotes the accumulation of nutrients and fundamentally alters both the physicochemical environment and interactions among the organisms therein (Flemming et al. 2016).

The genes of the *tad* locus belong to a group of putative adhesins (Hatfaludi et al. 2010). The Tad system, which is present in many bacterial genera, is the main subtype of the type III secretion system, and related genes encode proteins necessary for the formation of FliP fimbriae, which can be essential for biofilm formation (Tomich et al. 2007, Hatfaludi et al. 2010). Among the four genes selected for analysis, *tadE* and *tadG* were detected in 100% of FC and swine lung isolates. In contrast, the frequency of the *tadB* and *tadD* genes was variable depending on the source. Similarly, Moraes et al. (2014) detected the *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadE*, *tadF* and *tadG* genes in 100% of isolates from swine lungs, except for *tadD*, as reported in the current study.

However, the presence or the absence of the gene establishes a linear relationship among samples, which may not be true, since the expression and the interaction are not considered. Furthermore, several genetic factors participate in biofilm formation (Beloin & Ghigo 2005), which is influenced by environmental factors, such as pH, temperature and concentration of nutrients in the medium (Steenackers et al. 2012, Flemming et al. 2016). Thus, these genetic factors, especially when they are involved in the early stages of biofilm formation, can be functionally replaced or overridden by others, depending on the media and growth conditions. Similarly, finding common bacterial biofilm gene-expression patterns through global expression analysis remains difficult (Beloin & Ghigo 2005).

The *tadD* gene encodes an adhesin with a non-specific adhesion pattern (May et al. 2001) and was previously investigated in genetic profile analysis studies of *P. multocida* strains isolated from swine, cattle and poultry (Tang et al.

2009, Katsuda et al. 2013, Moraes et al. 2014, Furian et al. 2016). These studies also highlight the presence of variations in the gene and its positive association with *P. multocida* serotype A (Tang et al. 2009) and negative association with serogroup D, as previously observed in a study by our group (Furian et al. 2016).

Although *tadD* is in a locus associated with the formation of biofilms, including the presence of biofilms in lung lesions in swine and cattle (Khamesipour et al. 2014, Moraes et al. 2014), the presence of *tadD* in individual strains in the current study was not significantly associated with biofilm formation capacity. This finding is probably explained by the presence of other genes of the same locus related to the formation of biofilms and mutations in the *tadD* gene that interfere with the adhesion potential of *P. multocida* (Fuller et al. 2000).

CONCLUSIONS

The evaluation of the biofilm formation capacity of *Pasteurella multocida* strains isolated from cases of FC and swine lung after slaughter demonstrated that the adhesion of these strains was usually weak, despite their ability to form biofilms on polystyrene surfaces.

The *tadB*, *tadD*, *tadE* and *tadG* genes of the *tad* locus were simultaneously detected in most of the analyzed strains, and a significant association was not observed ($p>0.05$) between the presence of these genes and the origin of the strain.

Similarly, there was no association ($p>0.05$) between the presence of the *tadB* or *tadD* genes and the biofilm formation capacity of the strains. Finally, low virulence strains may suggest a higher capacity for biofilm formation on polystyrene plates.

REFERENCES

- Beloin C. & Ghigo J.M. 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol.* 13(1):16-19.
- Borges K.A. 2015. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no Campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Tese de Doutorado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Boyce J.D., Harper M., Wilkie I.W. & Adler B. 2010. *Pasteurella*, p.325-346. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer G. & Thoen C.O. (Eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th ed. Blackwell Publishing, Ames.
- Cabarkapa I., Skrinjar M., Levic J., Kokic B., Blagojevic N., Milanov D. & Suvajdzic L. 2015. Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis *in vitro*. *Acta Vet. Beograd* 65(3):371-389.
- Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L. & Beachey E.H. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37:318-326.
- Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A. & Percival S.L. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121:1-17.
- Corney B.G., Diallo I.S., Wright L.L., Hewitson G.R., De Jong A.J., Burrell P.C., Duffy P.F., Stephens C.P., Rodwell B.J., Boyle D.B. & Blackall P.J. 2007. *Pasteurella multocida* detection by 5' *Taq* nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J. Microbiol. Methods* 69:376-380.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. & Lappin-Scott H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
- Costerton J.W., Stewart P.S. & Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.

- Dewanti R. & Wong A.C. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 26:147-164.
- Donlan R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8(9):881-890.
- Donlan R.M. & Costerton J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167-193.
- Donlan R.M., Murga R., Bell M., Toscano C.M., Car J.H., Novicki T.J., Zuckerman C., Corey L.C. & Miller J.M. 2001. Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. *J. Clin. Microbiol.* 39:750-753.
- Ewers C., Lübke-Becker A., Bethe A., Kiebling S., Filter M. & Wieler L.H. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.* 114:304-317.
- Ferreira T.S., Felizardo M.R., Sena de Gobbi D.D., Gomes C.R., Nogueira Filner P.H., Moreno M., Paixão R., Pereira J.J. & Micke Moreno A. 2012. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in Brazil. *Sci. World J.* 2012:685028.
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A. & Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(9):563-575.
- Freeman J., Falkiner F.R. & Keane C.T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42:872-874.
- Freeman K., Woods E., Welsby S., Percival S.L. & Cochrane C.A. 2009. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can. J. Microbiol.* 55:197-202.
- Fuller T.E., Kennedy M.J. & Lowery D.E. 2000. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29:25-38.
- Furian T.Q., Borges K.A., Laviniki V., Rocha S.L.S., Almeida C.N., Nascimento V.P., Salle C.T. & Moraes H.L.S. 2016. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. *Braz. J. Microbiol.* 47:210-216.
- Furian T.Q., Borges K.A., Rocha S.L.S., Rodrigues E.E., Nascimento V.P.d. 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. *Pesq. Vet. Bras.* 33:177-182.
- Glisson J.R., Sandhu T.S. & Hofacre C.L. 2008. Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, riemerellosis and pseudotuberculosis, p.12-18. In: Dufour-Zavala L. (Ed.), *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, 5th ed. American Association of Avian Pathologists, Georgia.
- Hall-Stoodley L. & Stoodley P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11:1034-1043.
- Harper M., Boyce J.D. & Adler B. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:1-10.
- Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A. & Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* 15(4):305-311.
- Hasset DJ., Sutton M.D., Schurr M.J., Herr A.B., Caldwell C.C. & Matu J.O. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol.* 17:130-138.
- Hatfaludi T., Al-Hasani K., Boyce J.D. & Adler B. 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 144:1-17.
- Hunt Gerardo S., Citron D.M., Claros M.C., Fernandez H.T. & Goldstein E.J. 2001. *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida* and *P. multocida* subsp. *Septica* differentiation by PCR fingerprinting and α -glucosidase activity. *J. Clin. Microbiol.* 39:2558-2564.
- Karched M., Bhardwaj R.G., Inbamani A. & Asikainen S. 2015. Quantitation of biofilm and planktonic life forms of coexisting periodontal species. *Anaerobe* 35(Pt A):13-20.
- Kawashima S., Matsukawa N., Ueki Y., Hattori M. & Ojika K. 2010. *Pasteurella multocida* meningitis caused by kissing animals: a case report and review of the literature. *J. Neurol.* 257:653-654.
- Khamesipour F., Montaz H. & Azhdary Mamoreh M. 2014. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Front. Microbiol.* 5:536.
- Kline K.A., Fälker S., Dahlberg S., Normark S. & Henriques-Normark B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5:580-592.
- Kubatzky K.F. 2012. *Pasteurella multocida* and immune cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:53-72.
- Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C. & Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322:1-16.
- Marquezini M.G. 2015. Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da enzima KPC em *Salmonella* spp. isoladas de aviário e linha de Abate de Aves. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- May B.J., Zhang Q., Li L.L., Paustian M.L., Whittam T.S. & Kapur V. 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*. *Pm70. Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98:3460-3465.
- Moraes D.F.S.D., Brandão L.N.S., Pitchenil L.C., Filho J.X., Morés N., Nakazato L. & Dutra V. 2014. Ocorrência de genes *tad* associados à formação de biofilme em isolados de *Pasteurella multocida* de pulmões de suínos com pneumonia. *Pesq. Vet. Bras.* 34:1147-1152.
- Narayanan A., Nair M.S., Karumathil D.P., Baskaran S.A., Venkitanarayanan K. & Amalaradjou M.A. 2016. Inactivation of *Acinetobacter baumannii* biofilms on polystyrene, stainless steel, and urinary catheters by octenidine dihydrochloride. *Front. Microbiol.* 7:847.
- Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G. & Read R.R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66:86-92.
- Pilatti R.M., Furian T.Q., Lima D.A., Finkler F., Brito B.G., Salle C.T.P. & Moraes H.L.S. 2016. Establishment of a pathogenicity index for one-day-old broilers to *Pasteurella multocida* strains isolated from clinical cases in poultry and swine. *Braz. J. Poult. Sci.* 18:1-6.
- Rajagopal R., Nair G.K., Mini M., Joseph L., Saseendranath M.R. & John K. 2013. Biofilm formation of *Pasteurella multocida* on bentonite clay. *Iran. J. Microbiol.* 5:120-125.
- Ribeiro W.L.C., Pinheiro A.R.A., Evangelista J.N.B. & Sales R.O. 2012. Rinite atrófica e sua importância na indústria suinícola: uma revisão. *Revta Bras. Hig. Sanid. Anim.* 6:21-35.
- Richards J.J. & Melander C. 2009. Controlling bacterial biofilms. *ChemBiochem.* 10:2287-2294.
- Romanò C.L., De Vecchi E., Vassena C., Manzi G. & Drago L. 2013. A case of a late and atypical knee prosthetic infection by no-biofilm producer *Pasteurella multocida* strain identified by pyrosequencing. *Pol. J. Microbiol.* 62:435-438.
- Ross R.F. 2006. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Anim. Health Res. Rev.* 7:13-29.
- Salimena A.P.S., Lange C.C., Camussone C., Signorini M., Calvino L.F., Brito M.A.V.P., Borges C.A.V., Guimarães A.S., Ribeiro J.B., Mendonça L.C. & Piccoli R.H. 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet. Res. Commun.* (Ahead of print)
- Silva C.F., Gehlen S.S., Webber B., Diedrich L.N., Pilotto F., Santos L.R., Tonido E.C., Nascimento V.P. & Rodrigues L.B. 2014. *Salmonella* enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. *Acta Scient. Vet.* 42:1-8.
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45:502-531.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic L., Savic B. & Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40:175-179.
- Sutherland I.W. 1997. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. *Pure Appl. Chem.* 69:1911-1917.

- Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q. & Chen H. 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 47:951-958.
- Tomich M., Planet P.J. & Figurski D.H. 2007. The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:363-375.
- Townsend K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M. & Dawkins H.J.S. 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:1096-1100.
- Wilkie I.W., Harper M., Boyce J.D. & Adler B. 2012. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 361:1-22.
- Wilson B.A. & Ho M. 2013. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clin. Microbiol. Revs* 26:631-655.

ANEXO E – 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
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 Aviária, 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 Aviária (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

Furlan TQ, Borges KA, Pllatti RM,
Almeida C, Nascimento VP do,
Salle CTP, Moraes HL de S



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

All isolates 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.*, 2012). Most cases of FC are caused by serogroup A and, more rarely, by types F and D (Dziva *et al.*, 2008). There is a recognized and documented association between capsule type and particular hosts and diseases (Harper *et al.*, 2012). The possible interrelationship between capsular type, pathogenesis and host predisposition to a particular serogroup has been suggested (Chung *et al.*, 1998). However, the molecular and cellular bases for these host and disease associations remain unknown (Harper *et al.*, 2012). Typing methods are used to study the pathogenesis and epidemiology of *P. multocida* as well as to investigate the diversity of isolates from different hosts (Christensen & Bisgaard, 2006).

The serogroups are usually identified with the passive hemagglutination test (Carter, 1955). However, other phenotypic and non-serologic tests have been proposed due to both the time required to perform the serologic test and the need for specific antiserum for each type of capsule. Furthermore, there is the possibility of agglutination failure with homologous antiserum (Davies *et al.*, 2004; Arumugam *et al.*, 2011). Certain serotypes of *P. multocida* exhibit distinctive features, which have been exploited for their rapid identification. For instance, serogroup A can be easily identified by cross-streaking with hyaluronidase-producing *Staphylococcus aureus* that depolymerizes the hyaluronic acid found in encapsulated type A *P. multocida* strains (Carter & Rundell, 1975). Serotype D strains typically produce a coarse flocculation via an unknown mechanism when acriflavine dye is added to a broth overnight culture (Carter & Subronto, 1973). Additionally, the elucidation of the genetic basis for capsule biosynthesis in more recent years has facilitated the development of a method for laboratory typing *P. multocida* isolates with a multiplex PCR assay based on specific gene sequences for each capsular type (Townsend *et al.*, 2001).

The objectives of this study were to develop a multiplex PCR protocol for the identification of capsular genes specific to serogroups A and D in strains of *P. multocida* isolated from FC cases and to compare these results with non-serologic phenotypic tests.

MATERIALS AND METHODS

Selected strains and DNA extraction

A total of 54 strains of *P. multocida* isolated from clinical cases of FC in southern Brazil were selected. The reference strains of *P. multocida* ATCC 15742 (capsular type A), ATCC 12945 (capsular type A), ATCC 12946 (capsular type B) and a toxigenic clinical sample (capsular type D) were selected as positive controls for multiplex-PCR and phenotypic tests. All samples were stored in sheep blood at a temperature of -70°C. Reactivation and preliminary tests for the confirmation of pure samples of *P. multocida* were performed according to Glisson *et al.* (2008). The isolates were reactivated in brain heart infusion broth (BHI - Oxoid; Cambridge, United Kingdom) and incubated at 37°C for 24 hours. After this period, the isolates were plated on blood agar base (Oxoid; Cambridge, United Kingdom) supplemented with 5% (defibrinated sheep blood) and on MacConkey agar (Oxoid; Cambridge, United Kingdom) where the bacterium rarely grows, to differentiate other members of the *Pasteurellaceae* family that can grow on this agar (Glisson *et al.*, 2008). The morphology of colonies grown in blood agar were evaluated. Catalase and oxidase tests were conducted in addition to Giemsa staining to observe the characteristics of the bacterial bipolar cells. A 1-mL aliquot of a BHI overnight culture for each sample was prepared to extract DNA using the NucleoSpin Tissue commercial kit (Macherey Nagel; Düren, Germany). Prior to multiplex PCR typing, a PCR protocol for species-specific amplification of the *kmt* gene was performed, as described by Townsend *et al.* (1998).

Table 1 - The capsule genes selected, the processes in which they are involved, primer sequences and amplicon sizes.

Gene	Process or enzyme involved	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Reference
<i>hyaD-hyaC</i>	Capsule type A biosynthesis	TGCCAAAATCGCAGTCAG TGCCATCATTGTCACTG	1044	Townsend <i>et al.</i> (2001)
<i>bcbD</i>	Capsule type B biosynthesis	CATTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGITTTCAATCC	760	Townsend <i>et al.</i> (2001)
<i>dcbF</i>	Capsule type D biosynthesis	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	Townsend <i>et al.</i> (2001)

Furlan TQ, Borges KA, Pilatti RM,
Almeida C, Nascimento VP do,
Salle CTP, Moraes HL de S



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

Multiplex PCR protocol

The multiplex PCR protocol proposed to detect capsular genes was established based on Townsend *et al.* (2001). In addition to the genes *hyaD-hyaC* and *dcfF*, a multiplex PCR protocol was performed to detect *bcbD*, a gene specific to serogroup B. The sequence of each primer pair and the expected size of each amplicon are described in Table 1. Briefly, the PCR mix consisted of 2.5 μ L of 10X PCR buffer, 1.25 μ L of 2.5 mM deoxynucleoside triphosphates, 2 μ L of each primer pair at 20 pmol (Invitrogen; Carlsbad, USA), 2 U of Taq DNA polymerase (Centro de Biotecnologia UFRGS; Porto Alegre, Brazil), 1.25 μ L of 2.5 mM $MgCl_2$, 5 μ L of DNA and sterile ultrapure water for a final volume of 25 μ L. Amplification was performed in a Swift MaxPro thermal cycler (ESCO Technologies, Singapore) under the following reaction conditions: initial denaturation (95°C for 3 minutes) followed by 30 cycles of denaturation (95°C for 30 seconds), annealing (55°C for 30 seconds) and elongation (72°C for 60 seconds) and a final elongation stage (72°C for 10 minutes). Electrophoresis of the amplified products was carried out in a 1% agarose gel (Invitrogen™, Carlsbad, USA) stained with ethidium bromide, and the amplified products were visualized in an ultraviolet light transilluminator (Pharmacia LKB MacroVue; Uppsala, Sweden). The negative controls were selected among different members of the *Pasteurellaceae* family (*Reimerella anatipestier* ATCC 11845, *Mannheimia haemolytica* ATCC 29694, *Bordetella avium* ATCC 35086 and *Pasteurella gallinarum* ATCC 13360). Lastly, PCR mix without the addition of extracted DNA was used as a negative control for the reaction.

Phenotypic tests

Two aliquots of a BHI overnight culture were selected for the identification of serogroup D strains with the acriflavine test and for identification of serogroup A strains with the hyaluronidase test, according to Carter & Subronto (1973) and Carter & Rundell (1975), respectively. For the acriflavine test, 2 mL of a BHI overnight culture was centrifuged at 6.000 rpm for 20 minutes, and 0.5 mL of acriflavine solution diluted at 1:1000 (Sigma Aldrich; Saint Louis, USA) was added to 0.5 mL of the concentrated culture obtained. The isolates that exhibited flocculation after an interval of 5 minutes were assigned to serogroup D (Figure 1). In order to identify serogroup A with the hyaluronidase test, strains were plated on blood agar (Oxoid; Cambridge, United Kingdom) in lines approximately 5 mm apart. Next, a *Staphylococcus aureus* strain that

produces the hyaluronidase enzyme was streaked at a 90° angle to the *P. multocida* lines. The plates were incubated at 37°C for 24 hours. As hyaluronic acid is the main chemical component of the capsular type A structure, those colonies exhibiting growth inhibition in close proximity to the *S. aureus* streak were assigned to serogroup A (Figure 1).

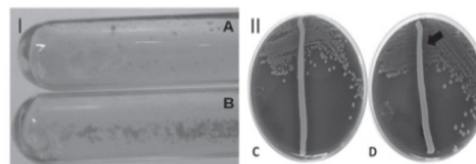


Figure 1 – I - Acriflavine test: (A) negative reaction. (B) Positive reaction between the inoculum of *P. multocida* type D and acriflavine solution. II - Hyaluronidase test: (C) colonies of *P. multocida* lack growth inhibition in the vicinity of the staphylococcal colony. (D) Colonies of *P. multocida* capsular type A (arrow).

STATISTICAL ANALYSIS

Data were statistically analyzed using the software program Statistical Package for Social Sciences, (SPSS Inc., Chicago, USA). Kappa coefficients and chi-square (χ^2) statistics were calculated to assess agreement and to determine the significance of the results, respectively. p-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The multiplex PCR protocol was able to detect the indicated genes of interest (Figure 2). The results of capsular typing indicated that there was a significant difference between the tests (Table 2). Using multiplex PCR, 49 isolates (90.74%) were classified into serogroup A and two

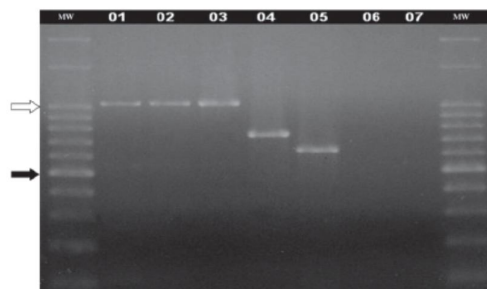


Figure 2 – Electrophoresis on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and the amplification products associated with the studied genes (multiplex PCR): *hyaD-hyaC* (1044 bp), *bcbD* (760 bp), *dcfF* (657 bp). Legend: MW = molecular weight marker (100 bp), 01 and 02 = samples; 03 = *P. multocida* ATCC 12945; 04 = *P. multocida* ATCC 12946; 5 = *P. multocida* toxigenic; 6 = *M. haemolytica* ATCC 29694; 7 = negative control for the reaction. The filled arrow indicates a 500-bp fragment; the white arrow indicates a 1000-bp fragment.

Furlan TQ, Borges KA, Pilatti RM,
Almeida C, Nascimento VP do,
Salle CTP, Moraes HL de S



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

Table 2 - Capsular typing of 54 *Pasteurella multocida* strains of avian origin with phenotypic tests and multiplex PCR.

Analysis	Serogroup			Total (%)
	A (%)	D* (%)	U** (%)	
Phenotypic test	41 ^a (75.93)	2 ^a (3.7)	11 ^a (20.37)	54 (100)
Multiplex PCR	49 ^b (90.74)	3 ^a (5.56)	2 ^b (3.7)	54 (100)

Different letters in the same column represent significant differences, X² (1) = 4.267/
p=0.034 (p < 0.05)

**Untypeable

isolates (3.7%) were not identified by the test. In contrast, only 41 samples (75.93%) were assigned to type A using the phenotypic test, whereas 11 samples (20.37%) were unidentifiable (Table 2). There was no significant difference in the number of capsular type D strains classified between the two tests. In terms of percent agreement, 70.37% of the strains were classified into the same serogroup by both the phenotypic tests and multiplex PCR (Table 3). However, the kappa coefficient (k = 0.017) indicated a poor agreement between the two methods (Landis & Koch, 1977). This fact is explained by the high frequency of serogroup A among the strains analyzed.

Table 3 - Correlation of capsular typing results between phenotypic tests and multiplex PCR.

	Serogroup	Multiplex PCR			Total
		A	D	U**	
Phenotypic tests	A	37	3	1	41
	D	2	0	0	2
	U**	10	0	1	11
	Total	49	3	2	54

Percent agreement: 70.37%

Kappa coefficient: 0.017 (0.062-0.212)

**Untypeable

DISCUSSION

The capsule is the main virulence factor identified for *P. multocida*, and a possible relationship between capsular type, pathogenesis and host susceptibility to a particular serogroup has been suggested (Chung *et al.*, 1998). Serogroup A was identified in 49 of 54 isolates by multiplex PCR. These results are consistent with the findings of Leotta *et al.* (2006), who obtained similar results with 8 of 9 strains isolated from poultry in Argentina. Similarly, Shivachandra *et al.* (2006) identified 92 strains as belonging to type A from

among 94 samples isolated from chickens in India. Jabbari *et al.* (2006) classified all of their 35 Iranian samples in the same serogroup. Type A is the main serogroup found in avian isolates (Rhoades & Rimler, 1989). In this study, only 3 isolates were found to belong to serogroup D. This serogroup is considered rare (Glisson, 2008). Davies *et al.* (2003) determined that only 8% of samples isolated in birds belonged to type B, 5% belonged to serogroup D and 4% belonged to type F.

Two strains were not identified with the multiplex PCR protocol adapted from Townsend *et al.* (2001). The authors of that study determined that 2-5% of strains were classified as untypeable. In other similar studies, 2-9% of samples were not classified (Dziva *et al.*, 2004; Jamaludin *et al.*, 2005; Leotta *et al.*, 2006). In this case, potential analysis could involve evaluation for the presence of a non-capsulated strain by electron microscopy, as one isolate was not identified by non-serological tests (Davies *et al.*, 2003). Another possibility may be that these strains belong to serogroup F, which was not analyzed in the current work.

A comparison of non-conventional serological tests and molecular methods for determining the capsular type revealed important variations in typing capability. The reduced capacity to determine the capsular type with conventional methods was also observed in other studies (Shivachandra *et al.*, 2006; Arumugan *et al.*, 2011). Since the development of a PCR technique for typing, this molecular method has been considered by some authors to be the gold standard technique for capsular typing, replacing phenotypic tests, particularly the passive hemagglutination test (Dziva *et al.*, 2008). The agglutination failure of serogroups A, D and F with homologous antisera is one of the main causes of reduced sensitivity in this phenotypic test (Jabbari *et al.*, 2006). Another important issue is that the passive hemagglutination test developed by Carter (1955) can be rendered ineffective by the loss of *P. multocida* capsule after repeated subcultures *in vitro* (Dziva *et al.*, 2008). In the study by Shivachandra *et al.* (2006) comparing both methods, 16% of 123 isolates from different avian species were not identified by conventional tests, whereas all samples were typed by multiplex PCR. Similarly, Arumugan *et al.* (2011) found that 48% of strains were non-typeable strains with the hyaluronidase and acriflavine test or through the use of specific antisera to identify the capsule types A, D and B, respectively.

Diverging classifications for these two methodologies have been noted in other studies (Ewers *et al.*, 2006;

Furlan TQ, Borges KA, Pilatti RM,
Almeida C, Nascimento VP do,
Salle CTP, Moraes HL de S



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

Arumugan *et al.*, 2011). The chemical similarity of polysaccharides, which comprise the capsule, may interfere with specificity of phenotypic tests (Ewers *et al.*, 2006).

The difficulty in obtaining capsular type-specific antisera as well as the necessity of identifying and typing field isolates in the early stages of infection or prior to the development of an efficient homologous vaccine for an FC challenge are important justifications for use of the molecular method (Shivachandra *et al.* 2006; Dziva *et al.*, 2008). Moreover, multiplex assay protocols allow for the simultaneous detection of different genes, reducing the amount of reagents and the time required to obtain results (Perry *et al.*, 2007).

In addition to the specific relationships between *P. multocida* serogroups and particular diseases and species, there is also a dominant geographical distribution of capsular types (Zaglic *et al.*, 2005). However, these relationships have exhibited variations in recent years. Examples include the increase in the number of pig pneumonia cases caused by capsular type D; this disease was formerly associated with serogroup A (Borowski *et al.*, 2007). Another example is the spread of hemorrhagic septicemia cases in cattle associated with serogroup B, which was previously concentrated only in Southeast Asia (Khan *et al.*, 2011). Likewise, type F, which was initially associated with avian species, has been identified in other hosts, including pigs and rabbits that presented respiratory diseases (Davies *et al.*, 2004; Jaglic *et al.*, 2004). Future studies with larger numbers of isolates from FC cases in different regions of the country may also exhibit this variation. It remains unclear whether a particular detection system may be associated with disease, host or population structure. Therefore, the use of phenotypic tests and confirmatory genotypic techniques remains crucial in establishing a definitive diagnosis of *P. multocida* infection. Finally, multiplex PCR is an alternative to comparative phenotypic tests for the identification of capsular *P. multocida* because it allows for the simultaneous, rapid detection of genes and provides a greater capacity for strain typing.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) of Brazil for funding this project.

REFERENCES

- Arumugam ND, Ajam N, Blackall PJ, Asiah NM, Ramli M, Maria J, Yuslan S, Thong KL. Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts – a comparison of phenotypic and genotypic methods. *Tropical Biomedicine* 2011;28:55-63.
- Borowski SM, Barcellos D, Mores N. Pasteurelose pulmonar. In: Sobestiansky J, Barcellos D, editor. *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial; 2007. p. 177-181.
- Boyce JD, Chung JY, Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Journal of Biotechnology* 2000; 83:153-160.
- Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida* I.A haemagglutination test for the identification of serological types. *American Journal of Veterinary Research* 1955;16:481-484.
- Carter GR, Rundell SW. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Veterinary Records* 1975;96:343.
- Carter GR, Subronto P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* using acriflavine. *American Journal of Veterinary Research* 1973;34:293-295.
- Christensen H, Bisgaard M. The genus *Pasteurella*. In: Dworkin M, editor. *The Prokaryotes*. New York: New York Springer; 2006. p.1062-1090.
- Chung JY, Zhang Y, Adler B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiology Letters* 1998;166:289-296.
- Davies RL, 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* 2003;91:169-182.
- Davies RL, Maccorquodale R., Reilly S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary Microbiology* 2004; 99:145-158.
- Dziva F, Christensen H, Van Leengoed LAMG, Mohan K, Olsen JE. Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. *Veterinary Microbiology* 2004; 102:117-122.
- Dziva F, Muhairwa AP, Bisgaard M, Christensen H. Diagnostic and typing options for investigating disease associated with *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 2008;128:1-22.
- Ewers C, Lübke-becker A, Bethe A, Kiebling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology* 2006;114:304-317.
- Glisson JR. Pasteurellosis and others respiratory bacterial infection. In: Saif Y.M, editor. *Diseases of Poultry*. Iowa:Blackwell Publishing; 2008. p.739-758.
- Glisson JR, Sandhu TS, Hofacre CL. Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, rimerellosis and pseudotuberculosis. In: Dufour-Zavala L, editor. *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*. Georgia: American Association of Avian Pathologists; 2008. p.12-18.
- Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters* 2006;265:1-10.
- Harper M, Boyce JD, Adler B. The key Surface Components of *Pasteurella multocida*: Capsule and Lipopolysaccharide. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2012;361:39-51.

Furlan TQ, Borges KA, Pilatti RM,
Almeida C, Nascimento VP do,
Salle CTP, Moraes HL de S



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

- Jabbari AR, Esmaelzadeh M, Moazeni Julia GR. Polymerase chain reaction of Pasteurella multocida capsules isolated in Iran. *Iran Journal Veterinary of Research* 2006;7:50-55.
- Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Hlozek P, Bartos M. Identification of Pasteurella multocida serogroup F isolates in rabbits. *Journal of Veterinary Medicine B* 2004;51:467-469.
- Jamaludin R, Blackall PJ, Hansen MF, Humphrey S, Styles M. Phenotypic and genotypic characterization of Pasteurella multocida isolated from pigs at slaughter in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 2005;53:203-207.
- Khan A, Saleemi MK, Khan MZ, Gul ST, Irfan M, Qamar MS. Hemorrhagic Septicemia in Buffalo (Bubalus bubalis) Calves Under Sub-Tropical Conditions in Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* 2011;43:295-302
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-174.
- Leotta GA, Vigo GB, 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* 2006;38:125-129.
- Nascimento VP, Gama NMSQ, Canal CW. Coriza infecciosa das galinhas, pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. In: Berchieri Júnior A, Silva EN, Di Fábio, J, Sesti, L, Zuanaze MAF, Eds. *Doenças das aves*. Campinas: Facta; 2009. p.503-530.
- Perry L, Heard P, Kane M, Kim H, Savikhin S, Dominguez W, Applegate B. Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 2007;15:176-198.
- Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR, Brogden KA. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of Pasteurella multocida to turkey air sac macrophages. *Avian Diseases* 1996;40:887-893.
- Rigobelo EC, Blackall PJ, Maluta RP, Ávila FA. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of Pasteurella multocida isolated from chickens and Japanese quails in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013;44:161-164.
- Rhoades KR, Rimler RB. Fowl cholera. In: Adlam C, Rutter JM, editor. *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press Limited; 1989. p.95-144.
- Shivachandra SB, Kumar AA, Gautam R, Singh VP, Saxena MK, Srivastava SK. Identification of avian strains of Pasteurella multocida in India by conventional and PCR assays. *The Veterinary Journal* 2006;172:561-564.
- Townsend KM, Frost AJ, Lee CW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of Pasteurella multocida isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1988;16:1096-1100.
- Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:924-929.
- Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, Adler B. Pasteurella multocida: Diseases and Pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2012;361:1-22.
- Zaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Pavlik I, Alexa P, Bartos M. Characterisation and comparison of Pasteurella multocida isolated from different species in the Czech Republic: capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotin production. *Veterinárni Medicína* 2005;8:345-354.