

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

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR.

Dissertação de Mestrado

Thales Quedi Furian

PORTO ALEGRE

2011

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

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR.

Autor: Thales Quedi Furian

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Avícola

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

PORTO ALEGRE

2011

F984p Furian, Thales Quedi

Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR. / Thales Quedi Furian; Hamilton Luiz de Souza Moraes, orient.– Porto Alegre : UFRGS, 2011.

94 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2011.

1. Avicultura 2. *Pasteurella multocida*: genética 3. Cólera aviária: *P. multocida* I. Moraes, Hamilton Luiz de Souza, Orient. II. Título.

CDD 619.602605

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Thales Quedi Furian

“PESQUISA DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *Pasteurella multocida* ATRAVÉS DO ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE MULTIPLEX-PCR.”

Aprovada em 26 AGO 2011

APROVADA POR:

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Membro da Comissão

Prof. Dr. Luiz César Bello Fallavena

Membro da Comissão

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ter iluminado todos os meus caminhos e todas as minhas decisões.

Aos meus pais, Arno e Jussara, pelas constantes demonstrações de amor incondicional, pelo esforço incalculável na minha formação e, principalmente, pelos valores repassados.

Ao meu irmão Thiago, um segundo pai na minha vida e um exemplo de grande inteligência. Agradeço pela nossa união que nos faz muito mais do que simples irmãos. Agradeço a minha namorada Karen pelo apoio, pelo carinho, pelo amor e por estar ao meu lado em todos os momentos.

A todos os funcionários, colegas de pós-graduação, estagiários e professores do CDPA pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço especialmente ao colega Silvio pela amizade e pelos ensinamentos e à colega Karen pela participação ativa e valiosa em todas as etapas deste trabalho.

A Dra. Sandra Borowski pelo auxílio em parte deste projeto e pela disponibilidade em todos os momentos necessários.

Ao meu chefe imediato, Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle pelo estímulo e pelo incentivo contínuo ao meu aperfeiçoamento profissional. Agradeço aos meus colegas veterinários, técnicos agrícolas e ao meu amigo Gilmar Bortolon por todos os ensinamentos práticos e pelas experiências vivenciadas durante os quase quatro anos de relacionamento em Marau.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, que tive a honra de conhecer durante a realização do seu projeto de doutorado, pela oportunidade de realizar este estudo. A ele também agradeço por todos os ensinamentos repassados com dedicação desde a época como estagiário do laboratório que foram fundamentais para a minha formação profissional.

RESUMO

Os atuais sistemas de criação na avicultura, baseados na alta densidade populacional, aumentam os riscos de disseminação de enfermidades, especialmente das doenças respiratórias e daquelas cujos agentes etiológicos possuem mais de um hospedeiro. A Cólera Aviária (CA) possui estas características e geralmente apresenta-se de forma aguda e com altos índices de morbidade e de mortalidade. Apesar de representar uma das patologias aviárias que deve ser considerada para o diagnóstico diferencial de enfermidades com notificação obrigatória que cursam com morte súbita, a patogenia e os fatores de virulência envolvidos na CA ainda estão pouco elucidados. O objetivo deste trabalho foi pesquisar quinze genes associados à virulência em 25 amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de casos de CA na região sul do Brasil através do desenvolvimento de protocolos de multiplex-PCR. Além disto, o presente estudo visou comparar a capacidade de tipificação capsular do método molecular com testes fenotípicos. Os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos foram capazes de detectar todos os genes propostos. Os genes *ompH*, *oma87*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *nanB*, *hyaD-hyaC* estiveram presentes em 100% das amostras (25/25). Os genes *sodA* e *nanH* em 96% (24/25), o gene *ptfA* em 92% (23/25) e o gene *pfhA* em 60% (15/25). Os genes *toxA*, *bcbD*, *dcbF* não foram identificados em nenhuma das amostras pesquisadas (0/25). A tipificação capsular através do teste molecular apresentou maior capacidade de detecção quando comparada aos testes fenotípicos, pois enquanto 36% (9/25) das amostras não foram identificadas pelo teste convencional, somente 8% (1/25) não foi tipificada através do multiplex-PCR. Foram obtidos seis diferentes perfis genéticos, sendo P1 (negativo para os genes *toxA*, *dcbF* e *bcbD*) o mais comum. Com este trabalho, concluiu-se que os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos tornam-se uma ferramenta bastante útil e rápida para a detecção simultânea dos genes de virulência. Apesar da alta frequência dos genes estudados e de todas as amostras pertencerem à mesma subespécie de *P. multocida*, foram observados seis perfis genéticos, os quais devem ser confirmados em um estudo com um maior número de amostras.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, genes de virulência, multiplex-PCR

ABSTRACT

*The current breeding systems in poultry, based on high population density, increases the risk of spread of pathologies, especially respiratory diseases and those whose etiologic agents have more than one host. Fowl Cholera (FC) has these features and generally is presented in an acute form and with high rates of morbidity and mortality. Even though it represents one of the several avian diseases that should be considered in the differential diagnosis of notifiable diseases that course with sudden death, pathogenesis and virulence factors involved in the FC are still poorly understood. The objective of this study was to investigate fifteen genes related with virulence in 25 samples of *Pasteurella multocida* isolated from FC cases in the southern region of Brazil through the development of multiplex PCR protocols. In addition, this study evaluated the ability of capsular typing comparing the method molecular with phenotypic tests. The multiplex-PCR protocols developed were capable to detect all the proposed genes. The genes *ompH*, *oma87*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *nanB*, *hyaD-hyaC*, *bcbD* and *dcbF* were present in 100% of the samples (25/25). Gene *sodA* and *nanH* in 96% (24/25), *ptfA* in 92% (23/25) and *pfhA* in 60% (15/25). Gene *toxA*, *bcbD* and *dcbF* were not identified in any of the samples studied (0/25). The capsular typing by molecular test presented a higher detection capability when compared to phenotypic tests, because while 36% (9/25) of 25 of samples were not identified by conventional testing, only 8% (1/25) was not typified by multiplex-PCR. Six different genetic profiles were obtained and P1 (negative to genes *toxA*, *dcbF* and *bcbD*) was the most common. With this work, it was concluded that the multiplex-PCR protocols developed can be a useful tool for rapid and simultaneous detection of virulence genes. Despite the high frequency of the analyzed genes and that all samples belong to the same subspecies of *P. multocida*, six genetic profiles were observed, which should be confirmed in a study with a larger number of samples.*

Key-words: Pasteurella multocida, virulence genes, multiplex-PCR

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Genes pesquisados, sequência dos <i>primers</i> utilizados, tamanho dos <i>amplicons</i> obtidos e referência bibliográfica dos <i>primers</i>	47
TABELA 2 -	Controles positivos utilizados nos protocolos de PCR.....	48
TABELA 3 -	Protocolos de multiplex-PCR estabelecidos e os genes pesquisados.....	49
TABELA 4 -	Condições do termociclador utilizados nos protocolos de Multiplex-PCR	49
TABELA 5 -	Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 25 amostras de origem aviária de <i>Pasteurella multocida</i> analisadas.....	50
TABELA 6 -	Distribuição dos perfis genéticos das 25 amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem aviária analisadas.....	51
TABELA 7 -	Distribuição dos perfis genéticos das 06 amostras de <i>Pasteurella multocida</i> de origem suína analisadas.....	51
TABELA 8 -	Tipificação capsular das 25 amostras de origem aviária através da sorotipagem convencional e da sorotipagem molecular.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Teste da hialuronidase.....	52
FIGURA 2 -	Teste da acriflavina.....	53
FIGURA 3 -	Eletoforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex1): <i>hyaD-hyaC</i> (1044pb), <i>bcbD</i> (760pb), <i>dcbF</i> (657pb).....	53
FIGURA 4 -	Eletoforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex2): <i>ptfA</i> (488pb); <i>hgbA</i> (419pb); <i>sodA</i> (361pb); <i>pfhA</i> (275pb)...	54
FIGURA 5 -	Eletoforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex3): <i>exBD-tonB</i> (1144pb); <i>toxA</i> (865pb), <i>nanH</i> (360pb).....	54
FIGURA 6 -	Eletoforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex4): <i>oma87</i> (948pb); <i>hgbB</i> (788pb); <i>nanB</i> (554pb); <i>sodC</i> (235pb).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> - Infusão Cérebro-Coração
CA	Cólera Aviária
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
kb	Quilo base (= 1.000 pares de base)
kDa	Quilo Dalton (= 1.000 Da)
kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
min	Minuto(s)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PIB	Produto Interno Bruto
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMT	<i>Pasteurella multocida Toxin</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic</i>
REA	<i>Restriction Endonuclease Analysis</i>
REP	<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
s	Segundo (s)
SOD	Superóxido Dismutase
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	<i>Pasteurella multocida</i>	14
2.1.1	Histórico.....	14
2.1.2	Classificação.....	15
2.1.3	Caracterização morfológica e bioquímica.....	16
2.2	Cólera Aviária	18
2.3	Patogenia	19
2.4	Epidemiologia	20
2.5	Diagnóstico	22
2.6.	Fatores de Virulência	25
2.6.1	Cápsula.....	26
2.6.2	LPS.....	30
2.6.3	Fímbrias e Adesinas.....	31
2.6.4	Toxina dermonecrótica.....	32
2.6.5	Sialidasas.....	33
2.6.6	Superóxido Dismutase.....	34
2.6.7	Porinas.....	36
2.6.8	Regulação e Aquisição de Ferro.....	37
2.7	Multiplex-PCR	40
3	MATERIAL E MÉTODO	43
3.1	Amostras	43
3.2	Tipagem capsular	44
3.3	Extração do DNA	44
3.4	Pesquisa de genes de virulência	45
3.4.1	Primers.....	45
3.4.2	Protocolos de PCR.....	45
3.4.3	Desenvolvimento dos protocolos de multiplex-PCR.....	47
4	RESULTADOS	50

5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	APÊNDICE A – Amostras de <i>Pasteurella multocida</i> : origem de isolamento, tipo capsular, hemólise, crescimento em ágar MacConkey, prova da oxidase e prova da catalase.....	87
	APÊNDICE B – Genes de virulência pesquisados: sigla, processo ou enzima do qual faz parte e função.....	88
	APÊNDICE C – <i>Primers</i> : denominação, gene de referência e número de acesso ao GenBank.....	89
	APÊNDICE D – Protocolos de PCR: composição e concentração dos reagentes do <i>mix</i> , número de ciclos da amplificação, condições do termociclador e concentração do gel de agarose utilizada para cada reação.....	90
	APÊNDICE E – Multiplex-PCR: Composição e concentração dos reagentes do <i>mix</i>	92
	APÊNDICE F – Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 06 amostras de origem suína de <i>Pasteurella multocida</i> analisadas.....	93

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de carne de frango, além de também ter consolidado a posição de líder em exportações de produtos avícolas, desde 2004, a frente de países tradicionais e competitivos como os Estados Unidos. A avicultura brasileira emprega mais de 4,5 milhões de pessoas que atuam de forma direta ou indireta, e responde por aproximadamente 1,5% da riqueza gerada no país. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a produção brasileira de carne de frango em 2010 foi superior a 12 milhões de toneladas de carne, representando 16,4% da produção mundial (UBABEF, 2011). Estes resultados estão de acordo com as previsões realizadas em 2009 que apontavam um crescimento da produção nacional superior a 3%, baseado nos indicadores gerais de crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) do país (UBABEF, 2010).

Apesar dos efeitos da crise financeira internacional em 2009 e do impacto inicial da valorização cambial, as exportações nacionais em 2010 contabilizaram um volume de praticamente 4 milhões de toneladas de carne, 5,1 % a mais do que o exportado no ano anterior (UBABEF, 2011). O aumento no volume de carne de frango exportado para mercados importantes como o Japão e a Rússia, a abertura de novos mercados como a China e a normalização do fluxo de comércio internacional no decorrer do ano de 2010 justificam os números obtidos.

A melhor renda financeira da população brasileira, o aumento da disponibilidade interna do produto, associado ao preço elevado da carne bovina e ao próprio crescimento do PIB nacional, também proporcionou o aumento do consumo per capita de carne de frango. Em 2010, o consumo interno recorde foi de 44,09 kg por habitante ano (UBABEF, 2011), número 12% superior ao consumo de 38,8 kg estabelecido em 2009 (UBABEF, 2010). Contudo, a importância de uma atividade produtiva para um país é mais claramente demonstrada pelo número de habitantes socialmente dependentes do setor. No Rio Grande do Sul, a avicultura gera 45 mil empregos diretos, 860 mil atividades indiretas e representa fonte de renda para 9.500 famílias de produtores integrados (ZANATTA, 2008).

Neste contingente de destaque sócio-econômico é que se encontram a produção avícola nacional e a importância do *status* sanitário dos plantéis. Os sistemas de criação

atuais, baseados na alta densidade populacional aumentam os riscos de disseminação de doenças, especialmente agravados se não forem adotadas medidas de biossegurança. Estas medidas possuem especial importância para aquelas enfermidades de fácil disseminação, como as doenças respiratórias, e para aquelas cujos agentes etiológicos possuem mais de um hospedeiro. Os riscos de disseminação podem ser acentuados nos casos em que os animais cronicamente infectados representam uma possível fonte de propagação do microrganismo.

Entre as doenças com estas características está a Cólera Aviária (CA), que geralmente apresenta-se de forma aguda, septicêmica e com altos índices de morbidade e de mortalidade dos lotes. O agente etiológico da CA é a *Pasteurella multocida*, bactéria que causa doença nas aves e em outras espécies animais de interesse zootécnico, refletindo em importantes perdas econômicas. Da mesma forma, a *P. multocida* também pode atuar como agente secundário em outras enfermidades, inclusive de síndromes respiratórias de difícil controle (ANDREATTI FILHO, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Apesar de representar uma das patologias aviárias mais antigas e uma doença para diagnóstico diferencial de enfermidades com notificação obrigatória que cursam com morte súbita como influenza aviária, a patogenia e os fatores de virulência envolvidos na CA ainda estão pouco elucidados (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006; DZIVA *et al.*, 2008).

Os principais fatores de virulência identificados em amostras de *P. multocida* são a cápsula e os lipopolissacarídeos. Entretanto, outros diversos fatores podem estar relacionados à capacidade do agente em infectar um hospedeiro, assim como de sobreviver em um ambiente hostil ou deficiente em nutrientes essenciais (HARPER *et al.*, 2006). Contudo, a frequência destes genes e o mecanismo envolvido na virulência nas diferentes espécies de hospedeiros acometidos pela *P. multocida* apresentam poucos estudos, principalmente em aves. O objetivo deste trabalho foi pesquisar quinze genes associados à virulência em amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos de CA na região sul do Brasil, além de otimizar a detecção dos mesmos através do uso da técnica de multiplex-PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pasteurella multocida*

2.1.1 Histórico

A doença foi inicialmente estudada na França por Chabert em 1782 (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Em 1836, no mesmo país, Maillet utilizou o termo Cólera Aviária (CA) pela primeira vez como denominação (NASCIMENTO *et al.*, 2009), em consequência da aparição súbita da doença, acompanhada de diarreia e de elevada taxa de mortalidade entre as aves (ANDREATTI FILHO, 2007).

Durante a segunda metade do século XIX, importantes avanços foram realizados na microbiologia a partir do questionamento a respeito da geração espontânea dos seres vivos e da natureza das doenças infecciosas (MADIGAN *et al.*, 2010). Assim, somente em 1877 e em 1878, Perroncito na Itália e Semmer na Rússia, realizaram a primeira identificação microscópica de *P. multocida* através da observação de tecidos lesados de aves que apresentavam uma bactéria arredondada presente de forma isolada ou aos pares (GLISSON, 2008; ANDREATTI FILHO, 2007).

Contudo, a descrição mais completa da CA foi realizada por Louis Pasteur em 1880, pesquisador homenageado com o nome dado ao gênero descrito (HARPER *et al.*, 2006). O mesmo pesquisador verificou posteriormente que o caldo de galinha era um meio apropriado para o crescimento da bactéria e estabeleceu em experimentos clássicos a atenuação do microrganismo para emprego na imunização de aves sadias (PASTEUR, 1881 *apud* HARPER *et al.*, 2006). O procedimento de atenuação proposto levou ao estabelecimento dos conceitos de imunidade e vacinação posteriormente utilizados em outras doenças de interesse em medicina veterinária e medicina humana, entre eles o desenvolvimento de vacinas também por Pasteur contra as doenças antraz e raiva (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.1.2 Classificação

Inicialmente, as amostras de *P. multocida* isoladas eram denominadas de acordo com o hospedeiro de origem, como por exemplo, *P. avicida* ou *P. aviseptica* em aves e *P. muricida* ou *P. muriseptica*, isolada em ratos. Entretanto, atualmente o termo *Pasteurella multocida* proposto por Rosenbusch e Merchant em 1939 é a denominação considerada oficial pelo Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (GLISSON, 2008).

A família *Pasteurellaceae* é constituída por dez gêneros, dentre os quais se destacam *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus* e *Avibacterium* (NASCIMENTO *et al.*, 2009). O surgimento das técnicas moleculares permitiu a diferenciação de cepas e o desenvolvimento de estudos filogenéticos. Desta forma, muitos dos agentes etiológicos que causam doenças respiratórias em aves, e que antigamente pertenciam ao gênero *Pasteurella*, foram designados em novas famílias ou gêneros, como a *Pasteurella haemolytica* que passou a ser denominada *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica*, a *Pasteurella gallinarum*, agora denominada *Avibacterium gallinarum* e o *Haemophilus paragallinarum*, agente causador da Coriza Infecciosa, descrito atualmente como *Avibacterium paragallinarum* (GLISSON, 2008). As atuais reclassificações taxonômicas estão baseadas principalmente na utilização de técnicas moleculares que realizam a análise comparativa da sequência do ácido ribonucléico (RNA) da porção ribossomal 16S bacteriana ou através da técnica de hibridização do ácido desoxirribonucléico (DNA) (OLSEN *et al.*, 2003 *apud* CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006; CHRISTENSEN *et al.*, 2007).

O gênero *Pasteurella* também é distinguido fenotipicamente de outros membros da família *Pasteurellaceae* pela não formação de β -hemólise, pela não fermentação da melibidose e pela produção de ácido a partir da fermentação dos açúcares frutose, galactose e manose (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). A espécie *Pasteurella multocida*, a mais importante do gênero em veterinária, é subdividida em quatro subespécies que incluem a estirpe *multocida*, a mais conhecida e estudada, e outras três: *gallicida*, *septica* e *tigris*, descrita por Capitini *et al.*(2002). As subespécies de *P. multocida* são classificadas de acordo com a diferente habilidade em produzir ácido a partir dos açúcares sorbitol e

dulcitol, na homologia do DNA e na atividade da enzima α -Glicosidase (MUTTERS *et al.*, 1985; GERARDO *et al.*, 2001; STAHEL *et al.*, 2009).

Todas as subespécies já foram descritas em surtos de CA. Contudo, a estirpe *multocida* é a mais isolada de galinhas e perus, conforme demonstra Snipes *et al.* (1990) que classificaram 520 amostras de *P. multocida* isoladas entre 1985 e 1988 na Califórnia, Estados Unidos. Da mesma forma, Fegan *et al.* (1995) caracterizaram fenotipicamente 110 isolados (67 provenientes de galinhas, 42 de perus e 01 de pato) e observaram que 91 amostras foram identificadas como pertencentes à subespécie *multocida*. Em trabalhos semelhantes realizados na Tanzânia e Argentina, a subespécie *multocida* também foi a mais comumente isolada (MUHAIRWA *et al.*, 2001, LEOTA *et al.*, 2006).

Além da divisão em espécies e subespécies, as amostras de *P. multocida* também são classificadas em cinco diferentes sorogrupos (A, B, D, E e F), de acordo com a presença de antígenos capsulares (CARTER, 1955), e em 16 sorotipos, conforme a distribuição dos antígenos somáticos (HEDDLESTON *et al.*, 1972). A combinação do sorogrupo A de *P. multocida* com os antígenos somáticos 1-3 ou 3-4 representam a maioria das amostras isoladas de surtos de Cólera Aviária nos Estados Unidos e na Inglaterra (BISGAARD, 2008).

2.1.3 Caracterização morfológica e bioquímica

A *Pasteurella multocida* é um bacilo Gram negativo, imóvel e não formador de esporos. Tende a formar bacilos largos, pleomórficos e cadeias ou filamentos de vários tamanhos após repetidos cultivos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). É um microrganismo anaeróbio facultativo, apresenta temperatura ótima de crescimento a 37°C em uma faixa de pH entre 7,2 e 7,8 (GLISSON, 2008). A coloração de esfregaços de sangue ou tecidos através das técnicas de Giemsa ou Wright resultam na observação de células com coloração bipolar típica (GLISSON *et al.*, 2008).

A superfície das colônias normalmente é lisa, brilhante e de coloração acinzentada. Contudo, ocorre variação significativa da morfologia da colônia de acordo com o hospedeiro de origem. As colônias apresentam diâmetro de 0,5 a 2,0 mm após 24 horas de

incubação e superior a 3,0 mm em períodos maiores de incubação (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006).

O microrganismo pode ser isolado do fígado, da medula óssea e do sangue de aves mortas ou de lesões localizadas nos casos de Cólera Aviária crônica (GLISSON *et al.*, 2003). O isolamento primário da bactéria pode ser realizado em ágar tripticase de soja (*Trypticase Soy Agar- TSA*), ágar sangue e ágar amido dextrose (*Dextrose Starch Agar – DSA*). A probabilidade de isolamento é aumentada com a suplementação dos meios com 5% de soro sanguíneo inativado (GLISSON *et al.*, 2008). O crescimento em ágar sangue não provoca hemólise e a bactéria não cresce em ágar MacConkey (BACK, 2004).

A presença da cápsula, comum em amostras virulentas, pode ser demonstrada pela coloração negativa de esfregaços com tinta nanquim e observação em microscópio de contraste de fase (GLISSON *et al.*, 2008). A tinta nanquim não penetra na cápsula e, conseqüentemente esta estrutura aparece como uma região clara circundando a célula, a qual se apresenta escura (MADIGAN *et al.*, 2010).

Outra possibilidade de observação da morfologia da colônia de *P. multocida* é através da técnica de microscopia de iluminação oblíqua. A iridescência é relacionada à presença ou ausência de cápsula nas colônias isoladas (GLISSON *et al.*, 2008). Colônias que são iridescentes contêm células encapsuladas, enquanto colônias não iridescentes (coloração azul ou azul acinzentada) contêm bactérias não capsuladas (GLISSON *et al.*, 2008).

Hughes (1930) estudou a morfologia de colônias de 210 amostras de *P. multocida* isoladas de dois diferentes lotes de aves durante o inverno nos Estados Unidos e observou diferença de iridescência de acordo com a evolução da doença. No primeiro lote, um caso agudo de Cólera Aviária, constatou-se que as cepas de *P. multocida* isoladas estavam associadas com colônias iridescentes. Por outro lado, o segundo lote constituído por aves infectadas cronicamente por *P. multocida* apresentou amostras azuis não iridescentes.

Em estudo desenvolvido por Heddleston *et al.* (1964), a iridescência manteve relação com a virulência das amostras. As células oriundas de colônias iridescentes ocorrem individualmente ou em pares, são encapsuladas e virulentas quando inoculadas em galinhas, perus, coelhos e camundongos. Já as células provenientes de colônias não iridescentes também estão presentes individualmente ou em pares, mas não são

encapsuladas, são ligeiramente virulentas em perus e avirulentas em galinhas inoculadas via mucosas aéreas.

Com relação à resistência química e física da *P. multocida*, o agente é inativado pelos desinfetantes comuns, luz solar ou calor. A bactéria é inativada a uma temperatura de 56° C por 15 minutos e a 60° C por 10 minutos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Segundo Glisson (2008), solução de formol a 1%, fenol, hidróxido de sódio, glutaraldeído ou cloreto de benzalcônio lisam $4,4 \times 10^8$ células de *P. multocida* suspensas em 1 mL de solução salina a 0,85% a uma temperatura de 24°C.

2.2 Cólera Aviária

Os microrganismos da família *Pasteurellaceae* estão envolvidos em várias doenças clínicas, principalmente naquelas de manifestação respiratória em mamíferos, aves, répteis e outros (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Entre estes, a *Pasteurella multocida* subespécie *multocida* é o agente causador de diversas doenças de grande impacto econômico nos animais, incluindo-se a septicemia hemorrágica em bovinos, a pneumonia enzoótica e a rinite atrófica em suínos, além da Cólera Aviária em aves (GLISSON, 2008).

Os membros do gênero *Pasteurella* são usualmente considerados microrganismos oportunistas em vertebrados. Os constituintes do gênero podem habitar a mucosa do trato respiratório superior e do trato genital de mamíferos e de aves sem causarem doenças (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006).

A CA apresenta distribuição mundial (BISGAARD, 2008) e representa uma das quatro patologias que incentivaram a criação da Divisão Veterinária do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (GLISSON, 2008). A enfermidade, na sua forma típica, caracteriza-se por desenvolver uma doença septicêmica que resulta em alta morbidade e alta mortalidade (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Aves doentes apresentam anorexia, cianose, estertores, descargas nasais e diarreia aquosa ou verde-mucóide. Contudo, a morte sem manifestação de sinais clínicos pode ocorrer em alguns surtos, sendo possível encontrar reprodutoras mortas nos ninhos (BACK, 2004). Desta forma, a apresentação aguda da CA deve ser diferenciada de casos suspeitos de envenenamento, influenza aviária e doença de Newcastle (GLISSON, 2008).

Nos casos agudos, observam-se hiperemia, petéquias ou hemorragias nas mucosas e serosas de diversos órgãos, mas as lesões também podem estar ausentes. Em poedeiras e matrizes de corte, também pode ocorrer postura abdominal, peritonite, ooforite e consequente atresia dos folículos ovarianos (CHARLTON *et al.*, 2006). Em casos agudos da infecção em perus, a presença de pneumonia com acúmulo de exsudato fibrino-caseoso é comum (CHARLTON *et al.*, 2006). A forma crônica da doença tende a apresentar lesões edematosas ou inflamatórias associadas com o local da infecção, sendo mais comuns a barbela, seios nasais e articulações em geral. Algumas aves podem apresentar torcicolo devido infecção na meninge (BACK, 2004).

2.3 Patogenia

A *Pasteurella multocida* é aparentemente um habitante normal das vias aéreas de animais saudáveis e pode ser mantida na região da orofaringe sem causar doenças em hospedeiros imunocompetentes por longos períodos (MUHAIRWA *et al.*, 2000). Por outro lado, o desequilíbrio da relação entre hospedeiro e bactéria pode levar ao desenvolvimento da Cólera Aviária (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Processos estressantes como a alimentação deficiente, as condições inadequadas de manejo, a sobrecarga fisiológica, a infestação parasitária e as infecções concomitantes são exemplos de fatores predisponentes ao desenvolvimento da CA (ANDREATTI FILHO, 2007).

Neste contexto, o trato respiratório superior constitui-se na principal porta de entrada para a bactéria e posterior colonização do trato inferior, a partir do qual a *P. multocida* rapidamente atinge o sistema vascular. Os mecanismos pelos quais a bactéria invade e coloniza o trato respiratório e outros tecidos ainda são desconhecidos (WILKIE *et al.*, 2000). Contudo, o trato respiratório pode não representar a única porta de entrada para a septicemia causada pela CA, considerando-se em alguns casos o trato gastrointestinal. Segundo Lee *et al.* (2000), o mecanismo de infecção nesta região é pouco conhecido devido à dificuldade de isolamento da *P. multocida* entre os outros microrganismos presentes no trato digestivo.

As cepas de *P. multocida* se multiplicam nos órgãos atingidos e causam lesões localizadas de necrose. A persistência da bactéria no local de infecção, assim como a

migração para outros tecidos, depende das características da amostra e da resposta imune do hospedeiro (BOYCE *et al.*, 2010). A presença de estruturas como a cápsula e o lipopolissacarídeo (LPS) confere resistência bacteriana ao sistema imune da ave (BOYCE; ADLER, 2000).

A multiplicação da *P. multocida* no sangue ainda não está esclarecida. De fato, é possível que a bacteremia terminal observada em CA esteja relacionada à multiplicação anterior do agente em tecidos como o fígado (BOYCE *et al.*, 2010). Em situações em que a população de *P. multocida* alcance um grande número, é provável que ocorra lise e consequente liberação de endotoxina em quantidade suficiente para lesar os tecidos do hospedeiro (NASCIMENTO *et al.*, 2009). As petéquias na serosa dos órgãos envolvidos, especialmente do epicárdio, são indicativas de coagulopatias associadas aos casos de endotoxemias (BOYCE *et al.*, 2010).

2.4 Epidemiologia

A maioria dos surtos de Cólera Aviária afeta galinhas, perus, patos e gansos. Entre as aves domésticas, os perus são mais susceptíveis, principalmente entre 16 e 40 semanas de idade. Desta forma, a maior mortalidade ocorre no período de produção das aves (GLISSON, 2008). A CA ocorre com maior frequência durante as estações com temperaturas mais baixas. Esta ocorrência sazonal é devida às circunstâncias que provocam a queda da resistência do organismo das aves e também devido a uma maior exposição aos fatores de susceptibilidade (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Lotes clinicamente recuperados de surtos de CA permanecem como carreadores da *Pasteurella multocida* e podem disseminar o agente para hospedeiros susceptíveis, sendo considerados os mais importantes reservatórios da infecção. A bactéria presente na região cloacal ou nas secreções orais contamina a água, a ração e o ambiente de produção (BACK, 2004; CHARLTON *et al.*, 2006).

Neste contexto, Muhairwa *et al.* (2000) realizaram o primeiro isolamento de *P. multocida* em lotes de galinhas através de suabes cloacais sem histórico da doença. Foram coletados 240 suabes de cloaca, obtendo-se 80 amostras positivas. Muhairwa *et al.* (2000)

sugerem que lotes normais podem ser carreadores da bactéria em surtos de CA, assim como as aves convalescentes.

Outro importante fator de risco à avicultura industrial é a ocorrência de surtos de CA em aves silvestres em regiões onde há produção avícola intensiva (NASCIMENTO *et al.*, 2009). A CA é descrita em um grande número de animais, incluindo-se cerca de 100 espécies de aves silvestres (KASTEN *et al.*, 1997). Contudo, nem todas as cepas de *P. multocida* são patogênicas a estas espécies, sendo um indicativo de que as aves silvestres poderiam ser um reservatório da bactéria em surtos de CA (SNIPES *et al.*, 1990).

Esta possível relação motivou a realização do trabalho de Petersen *et al.* (2001), que infectaram experimentalmente galinhas, perus, perdizes e faisões com uma amostra de *P. multocida* (40605-1) isolada de aves silvestres na Europa. O reisolamento da bactéria a partir do baço e a alta mortalidade encontrada nas aves inoculadas confirmaram as aves silvestres como reservatório do agente e a necessidade da adoção contínua das práticas de biossegurança (PETERSEN *et al.*, 2001).

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

Os casos de CA são comuns entre gansos e patos, tanto em criações semi-intensivas como em áreas de reservas ambientais. As taxas de mortalidade podem alcançar 50% entre os patos e até 80% entre os gansos (BACK, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Como exemplo, a região norte da Califórnia e o *Muleshoe National Wildlife Refuge*, área de reserva de animais selvagens no Texas, são duas regiões nos Estados Unidos em que a CA é enzoótica entre aves aquáticas (GLISSON, 2008).

Da mesma forma que as aves silvestres, muitas espécies de mamíferos são carreadores de *P. multocida* e podem contaminar as aves domésticas (CHARLTON *et al.*, 2006). Gatos e ratos são importantes reservatórios nas granjas avícolas e em criações semi-

intensivas (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Em uma investigação epidemiológica realizada em sistemas de produção *free-range* no continente africano, isolou-se a bactéria de 68% dos gatos da região estudada (MUHAIRWA *et al.*, 2001). A análise da virulência de *P. multocida* isoladas de diferentes mamíferos comumente encontrados em zonas rurais demonstra que as cepas de origem suína são as mais patogênicas para as aves (GLISSON, 2008).

Apesar da *P. multocida* poder causar doença no homem, não existem evidências de que amostras isoladas de aves sejam patogênicas para os humanos ou que estas constituam algum risco para a saúde pública (BACK, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2009). A infecção no homem geralmente está associada a arranhaduras e mordidas de cães e gatos (HOLS *et al.*, 1992; GERARDO *et al.*, 2001). As lesões observadas são a celulite, as linfagites e, mais raramente, o desenvolvimento de abscessos e artrites sépticas (EWERS *et al.*, 2006). Ocasionalmente, a *P. multocida* pode estar envolvida em infecções sistêmicas com a ocorrência de meningites e de endocardites, especialmente em pacientes imunodeprimidos (KAWASHIMA *et al.*, 2010). Casos recentes de meningite em humanos, causados por *P. multocida*, relatam o contato direto com animais de companhia, especialmente com superfícies mucosas sem a ocorrência prévia de lesões de pele como causa para o surgimento da doença (BOERLIN *et al.*, 2000; PER *et al.*, 2010).

2.5 Diagnóstico

A coleta de fígado, medula óssea, sangue cardíaco e de lesões localizadas em apresentações crônicas, além de fragmentos de cérebro em casos de contaminação ou autólise dos tecidos anteriores, são as amostras de eleição nos casos suspeitos (GLISSON *et al.*, 2008). Embora o histórico clínico, a sintomatologia e as lesões encontradas na necropsia serem sugestivas de casos de Cólera Aviária, a *Pasteurella multocida* deve ser isolada e identificada no laboratório (CHARLTON *et al.*, 2006).

Um grande número de testes bioquímicos está disponível para a identificação de *P. multocida*, mas muitas vezes são empregados apenas nos estudos de caracterização taxonômica da família *Pasteurellaceae* (CHRISTENSEN *et al.*, 2007). Outra possibilidade é a inoculação dos materiais suspeitos em camundongos através das vias intraperitoneal,

intramuscular e subcutânea. Amostras de *P. multocida* geralmente ocasionam a morte do hospedeiro em 24 a 48 horas após a inoculação. Culturas puras da bactéria podem ser obtidas a partir do baço, fígado e sangue cardíaco destes animais (BACK, 2004; DZIVA *et al.*, 2008; GLISSON, 2008).

Contudo, a mortalidade dos camundongos inoculados depende do grau de virulência das amostras analisadas. Christensen *et al.* (2007) observaram que menos da metade dos 241 isolados nasais de suínos em casos de rinite atrófica ocasionaram a morte dos camundongos. Os autores sugerem a passagem do microrganismo nestes hospedeiros e posterior semeadura em meios de cultura apropriados para aumentar a taxa de isolamento da bactéria. Trabalhos semelhantes que utilizam esta técnica em amostras originárias de aves apresentam a mesma conclusão (MUHAIRWA *et al.*, 2000; MUHAIRWA *et al.*, 2001). O mesmo procedimento é indicado nos estudos epidemiológicos que buscam a identificação de carreadores do agente. Por outro lado, devido às questões de bem estar animal, deve ser utilizada somente quando outras ferramentas não estiverem disponíveis (DZIVA *et al.*, 2008).

O diagnóstico presuntivo da CA é frequentemente realizado associando-se as informações do caso com ferramentas laboratoriais mínimas que incluem a morfologia da colônia, o odor característico, a bipolaridade da bactéria, as reações positivas nos testes de catalase e oxidase e a inibição do crescimento em ágar MacConkey. Contudo, o uso destes testes fenotípicos pode acarretar em erros de identificação entre as diferentes espécies (DZIVA *et al.*, 2008).

O difícil isolamento da *P. multocida* a partir de regiões normalmente contaminadas, como a região nasal, associado ao período necessário para obtenção de subcultivos puros motivaram o desenvolvimento de novas metodologias (TOWNSEND *et al.*, 1998). Neste contexto, o desenvolvimento e emprego da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) específico para a detecção de *P. multocida* representou um importante avanço para um diagnóstico rápido e sensível nos casos suspeitos de CA. Entretanto, a associação das ferramentas fenotípicas e dos métodos genotípicos continua sendo fundamental para o diagnóstico da doença (DZIVA *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

O primeiro exemplo de utilização desta técnica foi desenvolvido por Kasten *et al.* (1997) e baseado na detecção do gene *pls*, codificador de uma proteína comum a *P.*

multocida, mas também presente em *Haemophilus influenzae*. Neste trabalho, 11 amostras de orofaringe coletadas de perus em granjas que sofreram um surto de CA apresentaram resultado positivo. Porém, quando se comparou a PCR desenvolvida com a inoculação em camundongos, a segunda demonstrou ser mais sensível.

Em 1998, Townsend *et al.* (1998) elaboraram um protocolo sensível e específico a partir da amplificação de um fragmento de 460 pb do gene cromossomal *kmt*, presente em todas as subespécies de *P. multocida*. A partir do mesmo protocolo, mas com algumas modificações, Lee *et al.* (2000) detectaram a bactéria em diferentes regiões do trato digestivo de galinhas infectadas experimentalmente por via oral, demonstrando a reprodutibilidade do teste frente aos inibidores da PCR que normalmente estão presentes nas amostras de fezes. Da mesma forma, Liu *et al.* (2004) elaboraram um protocolo de PCR espécie-específica baseado na detecção de dois genes reguladores da transcrição, *Pm0762* e *Pm1231*, importantes no diagnóstico de CA e possivelmente no controle da virulência de *P. multocida* em diferentes ambientes.

A maioria das amostras isoladas em casos de CA é formada por ácido hialurônico, constituinte principal das cepas do tipo A capsular (DZIVA *et al.*, 2008). Assim, protocolos de PCR baseados em um fragmento da região codificadora (genes *hyaC* e *hyaD*) da cápsula foram constituídos em diferentes trabalhos (GAUTAM *et al.*, 2004; SHIVACHANDRA *et al.*, 2004). Contudo, deve-se considerar a possibilidade do isolamento de cepas dos tipos capsulares B, D e F em surtos de CA, mesmo que mais raramente reportadas (DZIVA *et al.*, 2008).

Recentemente, um ensaio 5' *Taq* nuclease desenvolvido por Corney *et al.*, (2007), a partir do reconhecimento de uma região variável do gene rRNA 16S entre as diferentes subespécies de *P. multocida*, demonstrou ser mais sensível que a PCR convencional e de aplicação no diagnóstico de pasteurelose em diferentes hospedeiros. Embora inicialmente descrito para a detecção nos casos de CA, o potencial para uma aplicação no diagnóstico de pasteurelose em outras espécies hospedeiras tem sido relatado. Cepas de *P. multocida*, isoladas de bovinos e suínos também foram detectadas no teste. A especificidade foi confirmada pelos resultados negativos obtidos com outras 27 espécies dentro da família *Pasteurellaceae* e algumas espécies selecionadas de bactérias e de vírus (DZIVA *et al.*, 2008).

Atualmente, os métodos de genotipagem de amostras de *P. multocida* são empregados em estudos epidemiológicos e na diferenciação de cepas isoladas em surtos de CA. A análise de enzima de restrição (REA – *Restriction endonuclease analysis*), a ribotipagem, a análise do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD – *Random Amplification of Polymorphic DNA*), a sequência palindrômica repetitiva (REP - *Repetitive Extragenic Palindromic - PCR*) e a tipificação por sequenciamento de múltiplos loci (MLST – *Multilocus Sequence Typing*) são as técnicas mais utilizadas (PEDERSEN *et al.*, 2003; DZIVA *et al.*, 2004; SHIVACHANDRA *et al.*, 2008).

Os testes sorológicos são raramente utilizados na rotina de diagnóstico devido às características da CA, que apresenta um curso agudo e com baixos títulos de anticorpos nos estágios iniciais da doença. Além disto, resultados positivos não devem ser interpretados como indicativos da presença de uma infecção ativa (GLISSON, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Contudo, a necessidade de monitoramento das respostas imunes geradas em lotes de galinhas e perus vacinados levou ao desenvolvimento da técnica de Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA*), disponível atualmente em kits comerciais (DZIVA *et al.*, 2008).

2.6 Fatores de virulência

A virulência é a capacidade relativa de um patógeno em causar doença (MADIGAN *et al.*, 2010). Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, os quais propiciam a colonização e a ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira (VIEIRA, 2009).

Os componentes estruturais das bactérias apresentam diferentes funções, mas também podem auxiliar na patogênese, atuando como fatores de virulência. Por outro lado, diversos componentes microbianos intra e extracelulares atuam unicamente como fatores de virulência (MADIGAN *et al.*, 2010). De acordo com Wassenaar *et al.* (2001), os genes que codificam tais fatores são divididos em três categorias: os genes de virulência verdadeiros, responsáveis diretos pelos danos celulares provocados, os genes associados à virulência, que regulam ou ativam a expressão da classe anterior, e os genes relacionados à patogênese

do microrganismo, que auxiliam na colonização, na invasão e na sobrevivência intracelular durante o processo infeccioso.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos para identificação de genes relacionados à virulência em *P. multocida* (BOYCE *et al.*, 2010). Contudo, a frequência destes genes em diferentes hospedeiros ainda é pouco conhecida. Além disto, os genes identificados podem ser classificados como virulentos somente na espécie animal testada, pois alguns fatores considerados fundamentais em alguns hospedeiros não são essenciais nos demais (EWERS *et al.*, 2006).

2.6.1 Cápsula

A classificação das amostras de *P. multocida* de acordo com a presença de antígenos capsulares é realizada através do teste de hemaglutinação passiva (CARTER, 1955). Contudo, os métodos de identificação dos sorogrupos baseados na hemaglutinação passiva caíram em desuso, porque provavelmente muitos isolados capsulados podem não aglutinar com antissoros homólogos (ARUMUGAM *et al.*, 2011). Fatores ligados ao hospedeiro também podem contribuir para dificultar a sorotipagem. Pode haver reação do soro de um animal normal com o antígeno da *P. multocida*, provavelmente porque a presença da bactéria na microflora normal promove um estímulo antigênico. Outra possibilidade é o animal possuir anticorpos naturalmente adquiridos contra epítomos de *P. multocida* que também estão presentes em outras bactérias da microbiota (BOROWSKI, 2001).

Devido a estas dificuldades técnicas, além do tempo necessário para a realização do teste de hemaglutinação passiva que requer antissoros específicos para cada tipo capsular, outras provas não sorológicas têm sido propostas. Os sorogrupos A, D e F são formados por cápsulas que contem mucopolissacarídeos que podem ser identificados através do uso de enzimas que clivam esta estrutura (GLISSON *et al.*, 2008). Carter e Rundell, (1975) desenvolveram um teste em que cepas do tipo A podem ser identificadas a partir da inibição do seu crescimento quando semeadas em meio de cultivo contendo uma amostra de *Staphylococcus aureus*, produtora de hialuronidase.

As cepas do tipo D são identificadas pela floculação produzida após a adição de acriflavina ao caldo contendo o microrganismo. Entretanto, alguns isolados do tipo F podem reagir de forma similar após a adição de acriflavina (CARTER; SUBRANTO, 1973). Os métodos de tipagem são utilizados não somente para investigar a diversidade das amostras de *P. multocida*, mas também para o estudo da patogenia e epidemiologia do agente (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006).

A maioria dos casos agudos de CA é causada por amostras do sorogrupo A (RHOADES; RIMLER, 1989; WOO; KIM, 2006; DZIVA *et al.*, 2008). Já a septicemia hemorrágica em ruminantes é relacionada principalmente aos sorogrupos B e E, sendo o último não relatado em aves. A rinite atrófica dos suínos, patologia associada com pneumonia e retardo do crescimento, é causada por amostras pertencentes ao sorogrupo D (HARPER *et al.*, 2006). A base biológica para justificar esta diferenciação entre os sorogrupos e a ocorrência de doenças específicas não está esclarecida (CHUNG *et al.*, 1998)

Outra alternativa aos testes sorológicos foi o desenvolvimento de um grande número de técnicas genéticas que permitem tal diferenciação (DeANGELIS *et al.*, 2002; DAVIES *et al.*, 2004; BOYCE *et al.*, 2010). Estas técnicas permitem a identificação da amostra quando a metodologia desenvolvida por Carter (1955) falha ou quando não foi possível realizar a definição do tipo capsular pelo teste fenotípico, devido a alguma mutação no *locus* de biossíntese da cápsula (BOYCE *et al.*, 2010). Trabalhos envolvendo clonagem e sequenciamento da região de biossíntese das cápsulas A e B e a análise da sequência nucleotídica dos tipos D, E e F permitiu a identificação de regiões específicas de cada sorogrupo (CHUNG *et al.*, 1998; BOYCE *et al.*, 2000a).

A cápsula do sorogrupo A de amostras aviárias é constituída principalmente por ácido hialurônico, um polímero formado por unidades alternadas dos ácidos D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina (BOYCE *et al.*, 2000b). Estudos moleculares determinaram que a porção do genoma responsável pela biossíntese da cápsula do tipo A é formada por 11 sequências abertas de leitura (ORF - *Open Reading Frame*) divididas em três diferentes regiões. A primeira delas é responsável pela tradução de proteínas envolvidas no transporte dos polissacarídeos da cápsula para a superfície, e a terceira envolve proteínas que são similares às encontradas em *Escherichia coli* e *Neisseria meningitidis* e que estão

relacionadas à substituição de fosfolípidos do ácido hialurônico (BOYCE *et al.*, 2000b). A segunda e mais importante região é constituída por cinco genes (*hyaABCDE*) envolvidos na tradução de enzimas que sintetizam monômeros ativos do açúcar e que atuam como polimerases.

Os genes *hyaA* e *hyaD* sintetizam enzimas semelhantes às glicosiltransferases e cada um deles é responsável pela adição de um monômero de açúcar ativado para a formação do polissacarídeo. Proteínas similares são encontradas nas bactérias *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus thermophilus*. Já o gene *hyaC* está relacionado com a tradução da enzima UDP-glicose desidrogenase, a qual é responsável pela conversão de UDP-glicose em UDP-ácido glicurônico, um precursor na formação da cápsula bacteriana. Nenhuma função é descrita para as proteínas HyaB e HyaE (CHUNG *et al.*, 1998).

A sequência nucleotídica da região de biossíntese da cápsula do tipo B apresenta 15 ORFs também divididas em três regiões que codificam proteínas com funções similares àquelas da cápsula do tipo A (BOYCE *et al.*, 2000a; BOYCE *et al.*, 2010). As cápsulas dos sorogrupos D e F, relacionados em casos menos frequentes da CA, são formadas por um dissacarídeo precursor da heparina e pelo polissacarídeo condroitina, respectivamente (DeANGELIS *et al.*, 2002).

Todos os polissacarídeos capsulares são glicosaminoglicanos idênticos aos componentes da matriz celular das células eucarióticas, exceto que a heparina e a condroitina presentes nas cápsulas D e F não são sulfatadas. Por esta razão, estas moléculas podem ser reconhecidas como componentes das células eucarióticas e não haver formação de resposta imune no hospedeiro infectado (DAVIES *et al.*, 2004; BOYCE *et al.*, 2010).

O nível de expressão dos genes capsulares é reduzido quando a bactéria está em contato com determinados antibióticos e na presença de baixa concentração de ferro. Melnikow *et al.* (2008) detectaram diminuição dos níveis de transcrição dos genes capsulares frente à novobiocina e ao trimetoprim através da técnica de microarranjo do DNA. Também observaram diminuição da espessura ou fragmentação da cápsula quando analisada por microscopia eletrônica. Da mesma forma, uma amostra de *P. multocida* pode perder a cápsula depois de repetidos cultivos em meios artificiais. Embora se acredite no

maior número de cepas acapsulares como resultado de mutações pontuais após diversas passagens *in vitro*, os mecanismos moleculares deste evento ainda não estão estabelecidos (ANDREATTI FILHO, 2007)

A perda espontânea da cápsula pode estar relacionada a uma mutação pontual em um regulador da transcrição, o gene *fis*, que está localizado entre as duas primeiras regiões das ORFS da cápsula do tipo A (STEEN *et al.*, 2010). Por outro lado, esta perda da cápsula poderia estar associada a um mecanismo de biossíntese dependente das condições ambientais em que a bactéria está inserida. Neste contexto, Watt *et al.* (2003) verificaram a reversão de amostras inicialmente não capsuladas para capsuladas quando inoculadas em camundongos.

A habilidade da *P. multocida* em invadir e se multiplicar no hospedeiro é reforçada pela presença da cápsula, um dos fatores de virulência mais importantes e melhor esclarecidos da espécie. O papel essencial da cápsula na patogenia da *P. multocida* foi exemplificado no trabalho desenvolvido por Chung *et al.* (2001) que construíram um mutante acapsular da amostra X-73, a partir da inserção de um cassete de resistência à tetraciclina no gene *hexA*, localizado na região 1 do *locus* capsular. Esta amostra passou a ser não letal em camundongos, assim como avirulenta em galinhas. Semelhante estudo foi elaborado a partir da mutação da amostra M1404 do sorogrupo B e apresentou resultado similar (BOYCE; ADLER, 2000).

Algumas funções atribuídas à cápsula e o conseqüente aumento da patogenicidade são a resistência à dessecação, a maior aderência a tipos celulares específicos, a atividade antifagocitária e a interação com o sistema complemento do hospedeiro (BOYCE *et al.*, 2000b). A importância da cápsula na aderência da *P. multocida* depende do tipo de amostra e de célula do organismo envolvida no processo. No estudo de Pruiboom *et al.* (1996), amostras do tipo capsular A demonstraram forte aderência aos macrófagos dos sacos aéreos de perus, ao contrário das amostras acapsulares. Além disto, o tratamento das cepas com a enzima hialuronidase e conseqüente despolimerização da cápsula aumentou a atividade fagocítica dos macrófagos e interferiu negativamente na aderência da bactéria às células. Da mesma forma, o tratamento com sulfato de condroitina, polissacarídeo similar ao ácido hialurônico, não interferiu na aderência da bactéria, demonstrando que existe uma

relação específica entre a estrutura capsular e um receptor glicoprotéico específico no hospedeiro.

Contudo, no experimento desenvolvido por Jacques *et al.* (1993), amostras de origem suína do tipo capsular D demonstraram menor aderência, quando comparadas com amostras acapsulares através da técnica de *dot-blot*. Segundo os autores, a presença da cápsula poderia interferir na função de aderência ao trato respiratório promovida por componentes externos da membrana (lipopolissacarídeo e fímbrias).

O principal papel da cápsula na virulência de uma determinada cepa de *P. multocida* está diretamente relacionado à maior resistência a fagocitose e à inibição do sistema complemento do hospedeiro (PRUIMBOOM *et al.*, 1996; CHUNG *et al.*, 2001). A cápsula confere hidrofiliçidade à superfície da bactéria, característica importante para que não ocorra a fagocitose (BOROWSKI, 2001). Em um estudo publicado em 2000, observou-se um aumento de aproximadamente sete vezes na sensibilidade à fagocitose de amostras acapsulares mutantes do tipo B:2. Estas amostras também foram 10^6 vezes menos virulentas do que as originais quando inoculadas em camundongos (BOYCE; ADLER, 2000).

2.6.2 LPS

O lipopolissacarídeo (LPS) é um importante componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram negativas e é composto por três regiões: cadeia de polissacarídeos (antígenos O), oligossacarídeo (região do *core*) e molécula lipídica (lipídeo A) (MADIGAN *et al.*, 2010). As amostras de *P. multocida* são classificadas em 16 sorotipos a partir da composição dos antígenos somáticos presentes no LPS (HEDDLESTON, 1972). O LPS, assim como a cápsula, apresenta importante papel na virulência. Qualquer mutação que gere a menor expressão gênica dos oligossacarídeos do LPS representa a diminuição de virulência das amostras de *P. multocida* nos casos de Cólera Aviária (BOYCE *et al.*, 2010).

A estrutura do LPS de *P. multocida* do sorotipo A:1, mais comumente estudada, demonstra a existência de duas formas diferenciadas de oligossacarídeos na estrutura nuclear do *core* (HARPER *et al.*, 2007a). A expressão simultânea destas duas estruturas é

somente descrita em *P. multocida* e em *Mannheimia haemolytica* e representa possivelmente uma vantagem à sobrevivência da bactéria no ambiente (BOYCE *et al.*, 2010). Também a presença de resíduos de fosfocolina ligados aos oligossacarídeos do *core* em algumas amostras de *P. multocida* auxiliam na maior adesão da bactéria às mucosas hospedeiras e na maior resistência aos antimicrobianos (HARPER *et al.*, 2007b).

O LPS é considerado uma endotoxina, entretanto a toxicidade varia de acordo com o tipo de hospedeiro infectado pela *P. multocida* (BOYCE *et al.*, 2010). A administração por via endovenosa de LPS purificado de cepas do sorogrupo B em búfalos mimetiza os efeitos da Septicemia Hemorrágica (HORADAGODA *et al.*, 2002). Contudo, perus geralmente são resistentes aos efeitos da endotoxina (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2006). As altas doses de endotoxinas liberadas em lises bacterianas podem causar a morte por choque hemorrágico e pela necrose dos tecidos (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.6.3 Fímbrias e Adesinas

Assim como o LPS, as fímbrias são estruturas protéicas presentes na superfície das células procarióticas e que conferem à bactéria a capacidade de adesão (MADIGAN *et al.*, 2010). Como a interação entre macromoléculas presentes na superfície das células hospedeiras e do patógeno são essenciais para o estabelecimento da colonização de tecidos lesados, as fímbrias também são consideradas fatores de virulência (BOYCE *et al.*, 2010).

Muitos genes de *P. multocida* que codificam fímbrias e adesinas, incluindo *ptfA*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf1* e *hsf2*, são semelhantes às encontradas em outras bactérias (HARPER *et al.*, 2006, CORNEY *et al.*, 2007). A maioria dos estudos é concentrada no isolamento e caracterização da fímbria do tipo IV (proteína PtfA) responsável pela ligação da *P. multocida* à superfície das células hospedeiras (DOUGHTY *et al.*, 2000; SIJU *et al.*, 2007; SELLYEI *et al.*, 2010). A análise das sequências codificadas pelo gene *ptfA* demonstram grande variação entre as amostras de *P. multocida* (DOUGHTY *et al.*, 2000), mas o papel de cada estrutura fimbrial na virulência da bactéria ainda não foi esclarecido (HARPER *et al.*, 2006).

Alguns estudos também demonstram a existência de dois genes, *pfhaB1* e *pfhaB2*, que codificam hemaglutininas filamentosas importantes na colonização do trato respiratório

superior e que também são encontrados na bactéria *Bordetella pertussis* (TATUM *et al.*, 2005). A proteína FHA também apresenta capacidade de ligar-se a proteína plasmática C4BP, a qual inibe o sistema complemento do hospedeiro infectado (TATUM *et al.*, 2005). A mutação de *pfhA* resulta em diminuição de virulência das cepas de *P. multocida* (FULLER *et al.*, 2000).

2.6.4 Toxina dermonecrótica

A toxina dermonecrótica (PMT- *Pasteurella multocida toxin*) representa o único tipo de exotoxina descrita em cepas de *P. multocida* (LAX; CHANTER, 1990) e está associada aos sinais clínicos e às lesões ocorridas nos casos de rinite atrófica progressiva em suínos. É expressa principalmente por amostras do sorogrupo D, e em um menor número de casos em amostras do tipo A (NAGAI *et al.*, 1994).

A PMT ocasiona a atrofia dos turbinados nasais de suínos devido à proliferação descontrolada de osteoclastos que promovem a reabsorção tecidual e a inibição da diferenciação em osteoblastos, necessária para a formação óssea (BOYCE *et al.*, 2010). Esta exotoxina também é um estimulador da mitose, o que induz alterações celulares como o rearranjo do citoesqueleto (ZYWIETZ *et al.*, 2001), e é altamente tóxica para os animais. Em camundongos, causa lesões necróticas na pele decorrentes de administração intradérmica e também pode ser letal quando aplicada por via intraperitoneal (PULLINGER *et al.*, 2004). Estes dois testes biológicos podem ser utilizados para se avaliar a toxigenicidade de amostras de *P. multocida*.

A PCR representa uma alternativa atual a estes testes, uma vez que apresenta uma maior sensibilidade e maior especificidade em diferentes trabalhos (NAGAI *et al.*, 1994; ATASHPAZ *et al.*, 2009). Em estudo com 24 amostras isoladas de suínos com pneumonia e pleurite, Borowski *et al.* (2001) identificaram nove amostras toxigênicas através de PCR e somente uma através da inoculação intraperitoneal em camundongos. Algumas possíveis hipóteses para estas diferenças são a possibilidade de ocorrência da supressão da expressão gênica *in vivo* após subcultivos da bactéria ou a existência de um gene defectivo, não funcional.

A PMT tem ação intracelular, ligando-se a receptores presentes na superfície de gangliosídeos e penetrando na célula através de endocitose. O sequenciamento do gene *toxA* demonstra que a relação de bases púricas e pirimídicas (guanina/citosina) é inferior ao percentual geralmente encontrado no genoma de *P. multocida* (MAY *et al.*, 2001), e que este gene apresenta um sítio de clivagem incomum para a enzima de restrição *HpaII*. Estas evidências, associadas à homologia das regiões que flanqueiam o gene com a sequência nucleotídica de bacteriófagos, sugerem que *toxA* tenha sido adquirido por via horizontal (PULLINGER *et al.*, 2004; BETHE *et al.*, 2009).

2.6.5 Sialidases

O ácido siálico, presente na natureza em aproximadamente 50 diferentes tipos, corresponde a um grupo de carboidratos complexos que contém nove carbonos (FÁTIMA *et al.*, 2005). Em mamíferos e aves, este ácido corresponde geralmente ao açúcar terminal de glicoproteínas e de glicolípideos das membranas celulares ou de glicoproteínas no soro (VIMR; LICHTENSTEIGER, 2002). O ácido siálico promove a estabilização das membranas celulares, o armazenamento de energia na forma de glicogênio ou amido e é componente de estruturas como a quitina (FÁTIMA *et al.*, 2005). O ácido siálico também atua como mediador na adesão celular e como receptor para bactérias e vírus (VIMR; LICHTENSTEIGER, 2002).

As sialidases ou neuraminidases são enzimas produzidas por alguns tipos de bactérias com o objetivo de remover o ácido siálico das células hospedeiras para utilizá-lo como fonte de carbono (HARPER *et al.*, 2006). A maioria das amostras de *P. multocida* produz estas enzimas. As sialidases NanH e NanB foram clonadas e caracterizadas a partir de cepas isoladas de casos de Cólera Aviária por Mizan *et al.* (2000), e diferem em relação à especificidade de utilização dos receptores celulares sialogliconjugados. Esta diversidade aumenta a capacidade metabólica da *P. multocida* no interior do hospedeiro, pois permitem a remoção do ácido siálico da maioria das glicoproteínas do hospedeiro (MIZAN *et al.*, 2000).

Além da atividade catabólica de *P. multocida* através das sialidases, esta bactéria também possui genes responsáveis pela biossíntese do ácido siálico (STEENBERGEN *et*

al., 2005). Desta forma, a bactéria pode expor este açúcar na sua membrana externa, mimetizando estruturas das células eucarióticas e evitando a ação do sistema imune do hospedeiro (VIMR; LICHTENSTEIGER, 2002). Através deste mecanismo de virulência, a *P. multocida* consegue colonizar o trato respiratório superior de diversos animais e invadir células da mucosa (HATFALUDI *et al.*, 2010).

A análise do sialometabolismo demonstra que a *P. multocida* codifica duas enzimas transferases (Pm0188 e Pm0508) que transferem o ácido siálico para a superfície de componentes celulares da bactéria, como o LPS e a cápsula. A inativação dos genes envolvidos na síntese destas transferases ou de proteínas que captam o ácido siálico do ambiente promove a atenuação das cepas de *P. multocida* (STEENBERGEN *et al.*, 2005; BOYCE *et al.*, 2010).

2.6.6 Superóxido Dismutase (SOD)

O ambiente aeróbico é potencialmente tóxico, devido à produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). As EROs compreendem um grupo de metabólitos ativos formados a partir do metabolismo do oxigênio e que possuem em sua estrutura química um elétron livre, o que lhes confere uma alta instabilidade e capacidade de reagir com diferentes moléculas presentes nas estruturas celulares (MATOS; FERNANDES, 2005). Os EROs podem ocasionar a oxidação de biomoléculas tais como o DNA, proteínas e lipídeos gerando, por exemplo, mutações genéticas, disfunção e agregação de proteínas e comprometimento de membranas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A peroxidação dos componentes da membrana plasmática ocasiona a inativação de receptores da membrana e enzimas, prejudicando a função celular e aumentando a permeabilidade do tecido (MATOS; FERNANDES, 2005). Esta reação também pode amplificar o dano celular através da geração de produtos oxidados, pois alguns deles são quimicamente reativos. A impossibilidade de se evitar a produção de EROS levou a evolução de um complexo sistema antioxidante composto por enzimas específicas ou de antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas C e E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A Superóxido Dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a dismutação das espécies reativas do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas. As SODs são classificadas de acordo com o metal ligante ao seu sítio ativo que pode ser cobre, zinco, ferro ou manganês, e estão presentes em diferentes compartimentos celulares, assim como em uma grande variedade de microrganismos e organelas celulares (McCORD, 2000).

A ferro superóxido-dismutase (FeSOD) e a manganês superóxido-dismutase (MnSOD) têm localização citoplasmática e estão envolvidas na remoção dos radicais ânions superóxidos gerados durante a respiração aeróbica em bactérias (FRIDOVICH, 1978). Como a membrana citoplasmática é impermeável às SODs, não ocorre a dismutação dos superóxidos na superfície celular e no periplasma, os quais ficam vulneráveis (LAINSON *et al.*, 1996). Neste contexto, a cobre-zinco superóxido-dismutase (CuZnSOD) ou Superóxido Dismutase I (SOD I), enzima geralmente encontrada no citosol de eucariotos, tem sido relatada no periplasma de muitos organismos procariotos patogênicos e comensais (LAINSON *et al.*, 1996).

A função da CuZnSOD na virulência de bactérias patogênicas consiste na capacidade da enzima de dismutar radicais superóxidos gerados fora da célula bacteriana. Assim, a localização de CuZnSOD no periplasma estaria protegendo a bactéria dos efeitos tóxicos dos radicais superóxidos produzidos fora da célula (WILKS *et al.*, 1998). A SOD I é composta por duas subunidades idênticas de 16 kDa que formam um homodímero (VALENTINE *et al.*, 2005). Cada subunidade é composta por um íon de cobre, um de zinco e uma ligação dissulfeto. Os dois últimos são responsáveis pela manutenção da conformação de alça da proteína que compreende o canal iônico do sítio ativo da enzima e o cobre constitui o elemento catalítico responsável pelas reações de oxidorredução (VALENTINE *et al.*, 2005). A SOD I é codificada pelo gene *sodC* e este foi utilizado como base para elaboração de protocolos de PCR (LAINSON *et al.*, 1996) e PCR em Tempo Real (GUENTHER *et al.*, 2008) a fim de identificar diferentes bactérias Gram negativas, incluindo-se membros dos gêneros *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Mannheimia* e *Pasteurella*.

A enzima MnSOD, a qual possui níveis de biossíntese regulados pelas concentrações de ferro e é principalmente encontrada em mitocôndrias, é codificada pelo

gene *sodA*. O sequenciamento deste gene também foi recentemente utilizado como modelo para a identificação de espécies de *Pasteurella* e *Mannheimia* (GAUTIER *et al.*, 2005).

2.6.7 Porinas

As porinas são proteínas que formam canais que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas hidrofílicas com massa molecular de aproximadamente 600 Da através da membrana externa. Estas proteínas são divididas em específicas e inespecíficas (HATFALUDI *et al.*, 2010). As porinas inespecíficas formam canais preenchidos por água e que permitem o trânsito de substâncias a partir da diferença de concentração entre o meio extracelular e o periplasma. Estes canais não apresentam sítios de ligação para grupos moleculares estruturalmente relacionados (MADIGAN *et al.*, 2010).

A OmpH representa a principal proteína de membrana externa (*Outer Membrane Protein* – OMP) presente no envelope da *P. multocida* e forma canais inespecíficos. A biossíntese de OmpH é regulada pelo gene *fur*, o qual codifica uma proteína reguladora da captação de ferro. Assim, os níveis de expressão de OmpH respondem negativamente às concentrações de glicose e de ferro no meio (BOSCH *et al.*, 2001).

Muitos trabalhos selecionam estas proteínas como antígenos na elaboração de vacinas contra a *P. multocida*, pois elas consistem em um fator imunogênico conservado entre as diferentes famílias bacterianas (LUO *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2007). O alinhamento genético dos 16 sorotipos de *P. multocida* demonstra variação no comprimento e na sequência nucleotídica restrita a duas regiões que codificam grandes alças presentes na estrutura secundária da proteína (HATFALUDI *et al.*, 2010). A proteína OmpH completa ou apenas seus fragmentos funcionam como epítomos específicos. Tanto Luo *et al.* (1999) utilizando um peptídeo sintético que mimetiza a região variável *Cyclic-L2*, quanto Lee *et al.* (2007) desenvolvendo uma vacina recombinante com OmpH, obtiveram resultados satisfatórios na proteção de galinhas desafiadas com cepas homólogas de *P. multocida*.

Outras porinas presentes em mitocôndrias, cloroplastos e na membrana externa de bactérias Gram negativas são as proteínas transmembrana em lâmina β . A proteína Oma87 é um exemplo desta classe de proteínas e está presente em *P. multocida*, auxiliando na

ligação de lipídeos ou outras proteínas na membrana externa da bactéria (HATFALUDI *et al.*, 2010). O domínio da Oma87 é expresso em outras bactérias patogênicas e este antígeno de superfície bacteriano também é considerado uma opção ao desenvolvimento de vacinas (TABATAI, 2008). Porém, ao contrário do experimento desenvolvido por Ruffolo e Adler (1996) utilizando camundongos como modelos, a vacinação com fragmentos desta proteína não gerou proteção em galinhas frente a amostras virulentas de *P. multocida* (MITCHISON *et al.*, 2000).

A expressão de OMPs geralmente é aumentada em condições de privação de ferro, e a imunização com estas proteínas apresenta maior resposta imune cruzada quando comparada com proteínas selecionadas de meios sem restrição do elemento (KHARB; CHARAN, 2010). Por outro lado, estudos proteômicos mais recentes demonstram pouca variação na expressão de OMPs em meios de cultura deficientes em ferro (PAUSTIAN *et al.*, 2001; BOYCE *et al.*, 2006).

2.6.8 Regulação e aquisição de ferro

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência das bactérias, pois participa de inúmeros processos biológicos essenciais como o transporte de oxigênio, a regulação gênica e a síntese de DNA (KREWULAK; VOGEL, 2008; MADIGAN *et al.*, 2010). Devido à toxicidade deste elemento, a concentração de ferro livre é bastante limitada e está sequestrada em proteínas como transferrina, lactoferrina e ferritina (HARPER *et al.*, 2006).

A *Pasteurella multocida*, assim como outras bactérias, desenvolveu mecanismos básicos para adquirir o ferro: através de agentes quelantes (sideróforos) que captam o ferro de hidróxidos férricos ou por receptores a partir de proteínas do hospedeiro (KREWULAK; VOGEL, 2008). O sequenciamento do genoma da amostra de *P. multocida* Pm70 por May *et al.* (2001) revela que 2,5% do genoma da bactéria – correspondente a 53 proteínas codificadas - são similares às proteínas envolvidas no metabolismo do ferro.

A captação de ferro em ambos os mecanismos requer a presença de uma proteína na membrana externa da *P. multocida* que funcione como um receptor específico, uma proteína ligante presente no periplasma, além de um complexo energético para o processo (BOYCE *et al.*, 2010). A energia do metabolismo do ferro é suprida pelo Complexo TonB,

o qual é formado pelas proteínas TonB, ExbB e ExbD que estão ancoradas na membrana interna da *P. multocida* (KREWULAK; VOGEL, 2008). Os três genes são transcritos de forma independente, apesar de estarem localizados em regiões próximas. Contudo, a mutação em um gene ocasiona a atenuação das cepas de *P. multocida*, o que demonstra a contribuição igualitária de cada proteína do Complexo TonB ao processo infeccioso (BOSCH *et al.*, 2001).

A transferrina apresenta um peso molecular de 80 kDa, o que impossibilita a sua passagem através da membrana externa da *P. multocida* e obriga o uso de alguns mecanismos para remoção do ferro na superfície externa da bactéria (KREWULAK; VOGEL, 2008). A extração de ferro ocorre através da ligação da transferrina a um complexo presente na membrana externa bacteriana formado por um dímero TbpA, associado a uma lipoproteína de superfície TbpB (HARPER *et al.*, 2006; BOYCE *et al.*, 2010). Enquanto TbpB apresenta o sítio inicial de ligação à transferrina, TbpA associa-se posteriormente ao complexo e apresenta na sua estrutura alças que forçam a separação dos domínios da transferrina, ocasionando a exposição e liberação do átomo de ferro. O ferro liberado é transportado da membrana externa para o citoplasma através da proteína FbpA (KREWULAK; VOGEL, 2008).

A pesquisa da presença do gene *tbpA* através de PCR revela que este gene está presente na maioria das cepas de *P. multocida* isoladas de ruminantes, mas não foi encontrado em amostras originárias de outros hospedeiros, incluindo aves (EWERS *et al.*, 2006). Entretanto, não se pode eliminar a possibilidade de que as amostras isoladas em outros animais possuam receptores de transferrina ainda não identificados (BOYCE *et al.*, 2010). A quantificação de RNAm através da técnica de microarranjo é utilizada em ambientes com baixa concentração ou com fontes definidas de ferro, e tem demonstrado o aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo de ferro quando apenas a transferrina está presente (PAUSTIAN *et al.*, 2001; BOYCE *et al.*, 2006). Além disto, o *locus* de *tbpA* é flanqueado por sequências de inserção, que permitem a ocorrência de recombinação transposicional e de mudança de virulência de cepas inicialmente apatogênicas (OGUNNARIWO; SCHRYVERS, 2001).

A maior fonte de ferro do hospedeiro são as proteínas ferritina e hemoglobina (KREWULAK; VOGEL, 2008). Como o ferro se encontra no interior destas proteínas, a

bactéria utiliza exotoxinas para provocar a lise dos eritrócitos. Contudo, a enzima responsável por esta atividade em *P. multocida* ainda não foi identificada. Em condições anaeróbicas, uma esterase (MesA) comum a *P. multocida* e *E. coli* demonstra possuir atividade hemolítica indireta (HUNT *et al.*, 2000). Oito receptores de membrana externa que se ligam à porção férrica da hemoglobina ou à própria hemoglobina foram identificados até então em amostras de *P. multocida* (BOSCH *et al.*, 2004).

A proteína HgbA, inicialmente identificada em amostras do sorogrupo D, é o exemplo mais importante e mais estudado de proteínas que se ligam à hemoglobina em *P. multocida* (HATFALUDI *et al.*, 2010). O gene *hgbA* é parte de uma unidade de transcrição composta por outros dois genes que codificam proteínas externas de membrana. Qualquer mutação em um destes dois genes é letal à bactéria (BOSCH *et al.*, 2002). A expressão gênica deste *operon* é regulada pela concentração de ferro, sendo que a sua expressão aumenta em até seis vezes em baixas concentrações de ferro ou após as primeiras horas de infecção em galinhas (PAUSTIAN *et al.*, 2001).

Outra proteína, denominada HgbB e de mesma função, foi identificada por Cox *et al.* (2003). A HgbB envolvida na captação de ferro em *P. multocida* é similar a outras proteínas com mesma função presentes em *H. influenzae* (COX *et al.*, 2003). De acordo com Paustian *et al.* (2002), a expressão de *hgbB* não é alterada em condições mínimas de ferro ou em galinhas infectadas. Outras proteínas que se ligam à hemoglobina estão presentes em *P. multocida* e são constitutivamente expressas (COX *et al.*, 2003).

O último mecanismo utilizado pelas bactérias para a captação de ferro é relacionado à utilização de sideróforos. Os sideróforos são pequenas moléculas quelantes de ferro que são secretadas por bactérias com a função de remover o ferro associado às glicoproteínas do hospedeiro (MADIGAN *et al.*, 2010; HATFALUDI *et al.*, 2010). O complexo é inicialmente desencadeado pela ligação do sideróforo com o ferro a uma proteína específica na superfície da bactéria (HATFALUDI *et al.*, 2010). Após esta ligação, o ferro é transportado para o interior da célula. Somente um sideróforo, denominado *Multocidin* e com estrutura química não determinada, foi identificado em *P. multocida* (BOYCE *et al.*, 2010). Três proteínas de membrana externa, com pesos moleculares de 76 kDa, 84 kDa e 96 kDa e sintetizadas em condições de privação de ferro, são capazes de ligar-se ao complexo do sideróforo (CHOI-KIMA *et al.*, 1991).

As proteínas do metabolismo do ferro possivelmente estão envolvidas na virulência da *P. multocida*, pois cepas mutantes e inativadas para a expressão dos genes *tonB* e *hgbA* são atenuadas em camundongos (FULLER *et al.*, 2000). Por outro lado, amostras de *P. multocida* apresentando o gene *hgbB* inativado a partir da inserção de um cassete de resistência na região promotora não alteraram a virulência das cepas em camundongos em dois diferentes experimentos (COX *et al.*, 2003, BOSCH *et al.*, 2004). A manutenção da virulência nestes casos estaria relacionada à expressão contínua de *hgbA*, o qual apresenta a mesma função do gene mutante (EWERS *et al.*, 2006).

2.7 Multiplex-PCR

Inicialmente descrito em 1988, o multiplex-PCR consiste na amplificação simultânea de múltiplas regiões do DNA, a partir da adição de mais de um par de *primers* aos reagentes do mix (O. HENEGARIU *et al.*, 1997). Esta técnica é utilizada em muitos estudos moleculares, como na análise de deleções de genes (CHAMBERLAIN *et al.*, 1988) e na detecção de mutações e sequências repetidas do DNA (MARKOULATOS *et al.*, 2002).

O anelamento de diferentes oligonucleotídeos deve ocorrer em uma mesma condição de temperatura, por esta razão a escolha do desenho dos *primers* e a otimização dos parâmetros da reação são grandes desafios do multiplex-PCR (SCHOSKE *et al.*, 2003). Esta otimização busca diminuir o aparecimento de bandas espúrias na eletroforese, especialmente pela formação de dímeros entre os diferentes *primers* (MARKOULATOS *et al.*, 2002). A eleição dos *primers* deve considerar o grau de homologia dos pares selecionados e priorizar aqueles que apresentam sequências de 18 a 28 pares de base e relação de bases púricas e pirimídicas (guanina/citosina) entre 45 a 60% (O. HENEGARIU *et al.*, 1997). Outros importantes fatores a serem considerados em relação aos *primers* são o uso de uma concentração máxima não superior a 0,5 μM e a proximidade das temperaturas de anelamento (MARKOULATOS *et al.*, 2002).

A alteração na concentração dos outros componentes da reação (dNTPs, MgCl_2 , tampão da reação, enzima Taq DNA-Polimerase) resultam em influências maiores na sensibilidade e especificidade do multiplex-PCR, quando comparado à PCR convencional.

Muitas destas variações são importantes para otimizar a reação, uma vez que os mesmos reagentes são requeridos para amplificação dos diferentes alvos (SCHOSKE *et al.*, 2003).

A concentração de $MgCl_2$ a ser utilizada é proporcional à quantidade de dNTPs empregada. Vários testes avaliando as diferentes combinações demonstram que o uso de 200 μM de cada dNTP para 1,5 a 2 mM de $MgCl_2$ geralmente é o ideal. A ação enzimática da Taq DNA-Polimerase é dependente da concentração de íons Mg^{+2} livres, os quais também se ligam ao dNTP, o que justifica porque o aumento da concentração do último sem a alteração do $MgCl_2$ pode inibir a PCR (O. HENEGARIU *et al.*, 1997).

Conforme Markoulatos *et al.* (2002), a concentração da enzima Taq DNA-Polimerase mais eficiente é em torno de 2,5 U para volumes de reação de 50 μL . O excesso de enzima associado ao glicerol da solução de estoque pode resultar em um desequilíbrio dos alvos amplificados.

De acordo com Schoske *et al.* (2003), os custos com reagentes e com preparação são menores com o uso do multiplex-PCR, pois diferentes alvos de diagnóstico são realizados em reação conjunta em um mesmo *ependorf*. Outra justificativa para uso desta técnica é a manipulação de apenas um tubo, o que reduziria as possibilidades de contaminação (MARKOULATOS *et al.* 2002).

Citam-se como possíveis desvantagens da técnica a ocorrência dos fenômenos de “PCR drift”, que se caracteriza pela variação da interação dos reagentes da reação, principalmente em temperaturas mais baixas do processo, e “PCR selection”, que é o mecanismo de favorecimento da amplificação de determinados alvos em detrimento de outros. Estes fenômenos resultam na diminuição da sensibilidade da técnica, o que justifica em alguns casos a necessidade do maior tempo de enriquecimento das amostras de origem antes da extração de DNA, a fim de se obter uma maior quantidade de material genético extraído (RAMESH *et al.*, 2002). Outro ajuste importante é a alteração da concentração dos *primers* em prol dos alvos mais fracamente amplificados após observação empírica (MARKOULATOS *et al.*, 2002).

Com exceção aos trabalhos que buscam a tipagem molecular das cápsulas de *Pasteurella multocida* (TOWNSEND *et al.*, 2001; JABBARI *et al.*, 2006; SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009; ARUMUGAM *et al.*, 2011), até então poucos experimentos baseados na detecção de outros genes de

virulência foram desenvolvidos utilizando-se a técnica de multiplex-PCR. Shayegh *et al.* (2009) desenvolveram um multiplex-PCR para a detecção dos genes de virulência *pfhA*, *tbpA* e *toxA* em 10 amostras de *P. multocida* isoladas de cabras. Da mesma forma, Atashpaz *et al.* (2009) realizaram pesquisa semelhante com os mesmos genes e mais o *hgbB* em 87 amostras de diferentes ruminantes.

3. MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO). Todos os equipamentos utilizados neste trabalho são pertencentes ao CDPA/UFRGS.

3.1 Amostras

Foram utilizadas 31 amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de duas empresas agropecuárias da região sul do Brasil, sendo 25 exemplares originários de casos clínicos de Cólera Aviária e 06 amostras isoladas de pulmões de suínos ao abate. Os exemplares suínos foram selecionados a fim de se avaliar a compatibilidade dos protocolos de PCR adaptados na detecção de genes em amostras isoladas de diferentes espécies. Todas as amostras estavam armazenadas em sangue total de ovino a uma temperatura de -80° C.

A reativação e os testes preliminares de confirmação das amostras puras de *P. multocida* foram realizados de acordo com Glisson *et al.* (2008). Estas cepas foram reativadas em um meio não seletivo de enriquecimento, caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* – BHI – Oxoid®), e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, as amostras foram semeadas por esgotamento em ágar sangue (Oxoid®), adicionado de 5% de sangue ovino, e em ágar MacConkey (Oxoid®). As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas.

Após este período, as colônias presentes no ágar sangue foram avaliadas de acordo com a sua morfologia. A coloração com Giemsa foi utilizada a fim de se observar a característica bipolar da célula bacteriana. Para a execução desta coloração algumas colônias do ágar sangue foram selecionadas e depositadas em lâmina estéril com adição de 25µL de solução salina a 0,85%. Por último, realizaram-se os testes de catalase e de oxidase. A origem de cada amostra e os dados obtidos nos testes estão disponíveis no APÊNDICE A.

3.2 Tipagem capsular

As 31 amostras de *Pasteurella multocida* foram testadas para os tipos capsulares A e D no Laboratório de Suínos do IPVDF, localizado em Eldorado do Sul (RS) em conjunto com a Dra. Sandra Borowski.

Para a identificação da cápsula tipo D, utilizou-se o teste da acriflavina, desenvolvido por Carter e Subronto (1973). Neste teste, as cepas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas *overnight* a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 minutos e 0,5 mL do concentrado obtido foi adicionado a 0,5 mL de solução de acriflavina neutra e diluída a 1:1000. As cepas que apresentaram aglutinação em um intervalo de 5 minutos foram consideradas como pertencentes ao sorogrupo capsular D.

A identificação das cepas do sorogrupo capsular A foi realizada através do teste de hialuronidase elaborado por Carter e Rundell (1975). O ácido hialurônico é o principal componente químico da estrutura capsular tipo A, e este método baseia-se na inibição de sua síntese na presença da enzima hialuronidase. Primeiramente, foi feita uma estria em ágar sangue com uma amostra de *Staphylococcus aureus* em todo o diâmetro da placa. Posteriormente, as cepas de *Pasteurella multocida* foram semeadas perpendicularmente à estria de *S. aureus*, formando um ângulo de 90°. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24 horas. Espera-se que apenas as colônias pertencentes ao tipo capsular A apresentem crescimento menor próximo à linha semeada com *S. aureus* (satelitismo negativo).

3.3 Extração do DNA

Separou-se uma alíquota de 1 mL de BHI *overnight* de cada amostra para a realização da extração do DNA através de tratamento térmico, conforme técnica descrita por Ewers *et al.* (2006). As amostras em BHI foram mantidas congeladas a -20°C por 10 minutos e depois concentradas por centrifugação (12.000 rpm por 2 minutos), sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 200 µL de água ultra pura. O material

foi mantido em banho-maria a 100°C por 10 minutos e o sobrenadante repassado para outro *ependorff*. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

3.4 Pesquisa de genes de virulência

Foram pesquisados 15 genes de virulência (*ompH*, *oma87*, *sodA*, *sodC*, *hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*, *nanB*, *nanH*, *ptfA*, *pfhA*, *toxA*, *hyaD-hyaC*, *bcbD*, *dcbF*) nas 31 cepas de *Pasteurella multocida*. A denominação e a função de cada um destes genes constam no APÊNDICE B. Todas as amostras foram classificadas como *P. multocida* através de um protocolo de PCR espécie-específica estabelecido no CDPA por Bringhenti (2010), a partir da amplificação de um fragmento de 460 pb do gene *kmt*.

3.4.1 Primers

Os *primers* ou iniciadores utilizados foram sintetizados na empresa Invitrogen. A denominação e sequência de cada *primer*, o gene de referência e o número de acesso ao GenBank encontram-se disponíveis no APÊNDICE C.

3.4.2 Protocolos de PCR

Os protocolos de PCR para pesquisa dos genes de virulência foram estabelecidos a partir de trabalhos anteriores. Para cada reação de amplificação, foi preparado um *mix* de reagentes composto por água ultrapura, solução tampão, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), um par de *primers* específicos para cada gene (Tabela 1), cloreto de magnésio (MgCl₂) e a enzima Taq DNA-Polimerase. Em todos os protocolos, adicionaram-se 2 µL de DNA extraído. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (*Swift MaxPro Thermal Cycler - ESCO Technologies®*) e a eletroforese dos produtos amplificados desenvolvida em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A visualização do produto amplificado foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (*Pharmacia LKB MacroVue*). A concentração dos reagentes em cada *mix*, o número de

ciclos da amplificação, as condições do termociclador e a concentração do gel de agarose utilizada para cada reação constam no APÊNDICE D.

Tabela 1 – Genes pesquisados, sequência dos *primers* utilizados, tamanho dos *amplicons* obtidos e referência bibliográfica dos *primers*.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Referências
<i>kmt</i>	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460	Townsend <i>et al.</i> (1998)
<i>ompH</i>	CGCGTATGAAGGTTTAGGT TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	438	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>oma87</i>	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	948	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>sodA</i>	TACCAGAATTAGGCTACGC GAAACGGGTTGCTGCCGCT	361	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>sodC</i>	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA TGGTGCTGGGTGATCATCATG	235	Lainson <i>et al.</i> (1996)
<i>hgbA</i>	TGGCGGATAGTCATCAAG CCAAAGAACCACTACCCA	419	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>hgbB</i>	ACCGCGTTGGAATTATGATTG CATTGAGTACGGCTTGACAT	788	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>exBD- tonB</i>	GGTGGTGATATTGATGCGGC GCATCATGCGTGCACGGTT	1144	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>nanB</i>	GTCCTATAAAGTGACGCCGA ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	554	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>nanH</i>	GAATATTTGGGCGGCAACA TTCTCGCCCTGTCATCACT	360	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>ptfA</i>	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC TCATGAATTCCTTATGCGCAAAATCCTGCT GG	488	Doughty <i>et al.</i> (2000)
<i>pfhA</i>	AGCTGATCAAGTGGTGAAC TGGTACATTGGTGAATGCTG	275	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>toxA</i>	CTTAGATGAGCGACAAGGTT GGAATGCCACACCTCTATA	865	Ewers <i>et al.</i> (2006)
<i>hyaD-hyaC</i>	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1044	Townsend <i>et al.</i> (2001)

<i>bcbD</i>	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	760	Townsend <i>et al.</i> (2001)
<i>dcbF</i>	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	Townsend <i>et al.</i> (2001)

Para cada protocolo, cepas de referência foram utilizadas como controle negativo e controle positivo da reação. Os controles negativos foram selecionados entre diferentes membros da família *Pasteurellacea*, microrganismos que possuem homologia com a *P. multocida*, mas que não podem hibridizar com as sequências alvo dos genes selecionados, assim determinando um resultado falso-positivo. Por último, utilizou-se um controle da reação, formado por todos os constituintes do mix da reação sem a adição do DNA extraído. Este controle permite a detecção de uma possível contaminação das amostras do PCR com DNA externo. Os controles negativos utilizados em todos os protocolos de PCR foram: *Reimerella anatipestier* ATCC 11845, *Mannheimia haemolytica* ATCC 29694, *Bordetella avium* ATCC 35086 e *Pasteurella gallinarum* ATCC 13360. As cepas utilizadas como controles positivos, assim como o tipo capsular e a espécie de isolamento constam na Tabela 2.

Tabela 2 – Controles positivos utilizados nos protocolos de PCR.

Controle Positivo	Tipo capsular	Espécie de isolamento
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC 15742 ^a	A	Peru
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC 12945 ^a	A	Galinha
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC 12946 ^a	B	Búfalo
<i>Pasteurella multocida</i> toxigênica ^b	D	Suíno

^a: Controle utilizado em todos os protocolos de PCR

^b: Controle utilizado apenas no protocolo de PCR para o gene *toxA*.

As cepas de referência (ATCC) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), com exceção à amostra de *Pasteurella multocida* toxigênica (TOX), isolada de caso de rinite atrófica em suínos e cordialmente cedida pela Dra. Sandra Borowski do Laboratório de Suínos do IPVDF.

3.4.3 Desenvolvimento dos protocolos de multiplex-PCR

A fim de viabilizar a detecção simultânea dos 15 genes de virulência de uma forma mais ágil, foram desenvolvidos quatro ensaios de multiplex-PCR (Tabela 3). O multiplex 1 consiste na tipificação capsular das amostras de *P. multocida* e foi adaptado do trabalho de Townsend *et al.* (2001). A concentração de dNTPs e dos *primers*, assim como a quantidade de Taq DNA-Polimerase, foram alteradas e adaptadas de acordo com as condições do laboratório.

Tabela 3 – Protocolos de Multiplex-PCR estabelecidos e os genes pesquisados.

Multiplex	Genes
Multiplex 1 (tipificação capsular)	<i>hyaD-hyaC, bcbD e dcbF</i>
Multiplex 2	<i>sodA, hgbA, ptfA e pfhA</i>
Multiplex 3	<i>exBD-tonB, nanH e toxA</i>
Multiplex 4	<i>oma87, sodC, hgbB e nanB</i>

Para o estabelecimento dos demais protocolos de multiplex-PCR, foram realizadas duas alterações nas condições do *mix* de reagentes em comparação às reações individuais de PCR. A primeira delas foi o volume de DNA utilizado, que passou de 2 μ L para 5 μ L. A segunda alteração foi a quantidade de Taq DNA-Polimerase de 1 Unidade para 2 Unidades. Além destas duas alterações, também modificou-se a concentração dos *primers* do gene *pfhA* de 10 pmol para 20 pmol no multiplex 2. A composição de cada *mix* consta no APÊNDICE E. Em relação às condições do termociclador, selecionaram-se temperaturas de anelamento dos *primers* intermediárias entre os protocolos iniciais (Tabela 4). A concentração do gel de agarose utilizada nos protocolos variou entre 1% e 1,5%.

Tabela 4 – Condições do termociclador utilizados nos protocolos de Multiplex-PCR.

Multiplex	Número de ciclos	Condições do termociclador		
		Desnaturação	Anelamento	Extensão
Multiplex 1	30	95°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 60seg
Multiplex 2	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 60seg
Multiplex 3	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 90seg
Multiplex 4	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 60seg

O genes codificador da proteína de membrana externa *ompH* não foi selecionado para os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos, pois apresentava *primers* com uma relação de bases púricas e pirimídicas (guanina/citosina) inferior a 40%.

A tipificação capsular através do teste fenotípico foi comparada estatisticamente com a técnica de multiplex-PCR 1. Utilizou-se o teste de kappa para estabelecer a concordância entre os resultados encontrados (ALTMAN; BLAND, 1994). De acordo com o valor obtido do coeficiente Kappa, os resultados foram interpretados como: sem concordância (0,0), com concordância muito ruim (<0,2), com concordância ruim (0,21 a 0,4), com concordância regular (0,41 a 0,6), com concordância boa (0,61 a 0,8) ou com concordância perfeita (>0,8).

4. RESULTADOS

Os protocolos de PCR convencional, assim como os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos foram capazes de detectar todos os genes propostos, tanto nas amostras de origem suína, quanto naquelas de origem aviária.

Os resultados obtidos para todas as amostras na PCR foram iguais aos apresentados pela detecção simultânea dos genes nos protocolos de multiplex-PCR. Da mesma forma, ambos foram específicos aos genes selecionados, pois não ocorreu amplificação das amostras utilizadas como controle negativo das reações. A relação das amostras de origem aviária e da frequência encontrada para os genes de virulência está exposta na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 25 amostras de origem aviária de *Pasteurella multocida* analisadas.

Gene	Amostras Positivas		Amostras Negativas	
	Total (n=25)	Total (%)	Total (n=25)	Total (%)
<i>ompH</i>	25	100	0	0
<i>oma87</i>	25	100	0	0
<i>sodA</i>	24	96	01	4
<i>sodC</i>	25	100	0	0
<i>hgbA</i>	25	100	0	0
<i>hgbB</i>	25	100	0	0
<i>exBD-tonB</i>	25	100	0	0
<i>nanB</i>	25	100	0	0
<i>nanH</i>	24	96	01	4
<i>ptfA</i>	23	92	02	8
<i>pfhA</i>	15	60	10	40
<i>toxA</i>	0	0	25	100
<i>hyaD-hyaC</i>	24	96	01	4
<i>bcbD</i>	0	0	25	100
<i>dcbF</i>	0	0	25	100

A partir dos resultados obtidos, as 25 amostras de *P. multocida* de origem aviária e as 06 amostras de origem suína foram agrupadas em 8 diferentes perfis genéticos (P1 – P8), conforme demonstram a Tabela 6 e a Tabela 7, respectivamente.

Tabela 6 – Distribuição dos perfis genéticos das 25 amostras de *Pasteurella multocida* de origem aviária analisadas.

Perfil genético	Número de amostras	Genes ausentes
P1	12	<i>toxA; dcbF; bcbD</i>
P2	08	<i>toxA; pfhA, dcbF; bcbD</i>
P3	02	<i>toxA; pftA; dcbF; bcbD</i>
P4	01	<i>toxA; nanH; dcdF; bcbD</i>
P5	01	<i>toxA; pfhA; sodA; dcbF; bcbD</i>
P6	01	<i>toxA; pfhA; hyad-hyaC, dcbF; bcbD</i>

Tabela 7 – Distribuição dos perfis genéticos das 06 amostras de *Pasteurella multocida* de origem suína analisadas.

Perfil genético	Número de amostras	Genes ausentes
P1	01	<i>toxA; dcbF; bcbD</i>
P2	01	<i>toxA; pfhA, dcbF; bcbD</i>
P7	03	<i>toxA; hgbB; dcbF; bcbD</i>
P8	01	<i>toxA; hgbB; pfhA; dcdF; bcbD</i>

Em relação à cápsula, 24 amostras de origem aviária analisadas foram identificadas como pertencentes ao tipo capsular A através da técnica de multiplex-PCR 01, sendo que apenas uma amostra não pôde ser identificada. Por outro lado, na sorotipagem convencional, através dos testes de hialuronidase e da acriflavina, 16 amostras foram classificadas como pertencentes ao tipo A e nove não foram tipificáveis. Os resultados obtidos através da sorotipagem convencional e através do multiplex-PCR 01 estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 – Tipificação capsular das 25 amostras de origem aviária através da sorotipagem convencional e da sorotipagem molecular.

Tipo capsular	Sorotipagem convencional		Sorotipagem molecular	
	Total (n=25)	Total (%)	Total (n=25)	Total (%)
A	16	64	24	96
D	0	0	0	0
NI*	09	36	01	8

*Não identificado

O valor do coeficiente Kappa encontrado comparando os dois testes foi de $K = 0,68$, indicando boa concordância entre os métodos (ALTMAN; BLAND, 1994).

A figura 1 é um exemplo da identificação das cápsulas do tipo A pelo teste da hialuronidase, enquanto a figura 2 demonstra a identificação do tipo D através do teste da acriflavina.



Figura 1. Teste da hialuronidase. (A) Colônias de *P. multocida* sem inibição do crescimento nas proximidades da estria formada por *S. aureus*. (B) Colônias de *P. multocida* do tipo capsular A apresentando inibição do crescimento próximo à estria de *S. aureus* - satelitismo negativo (seta).

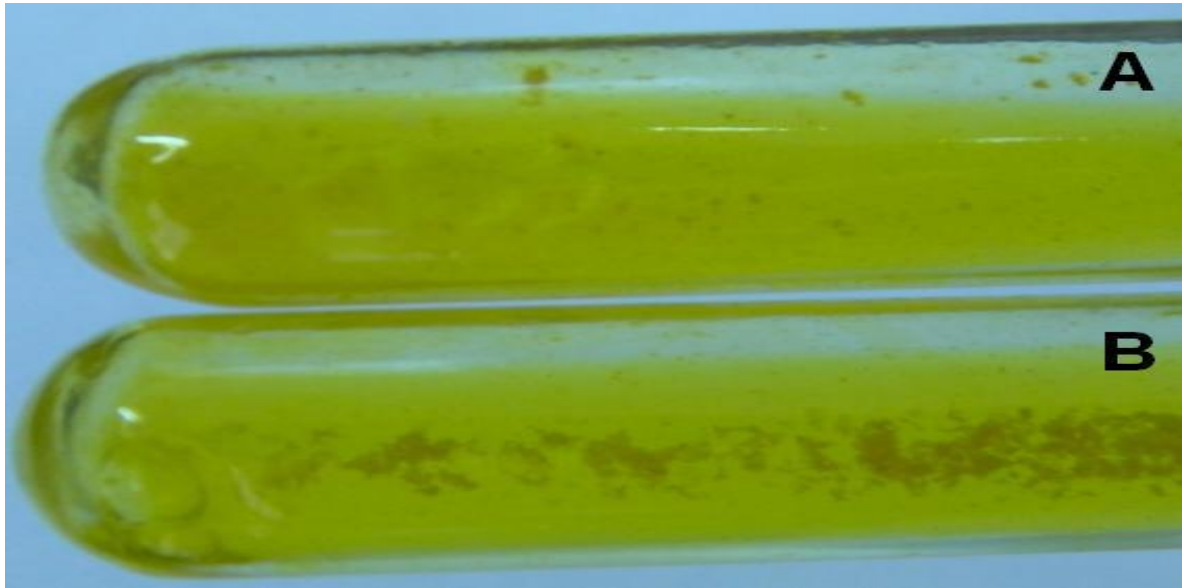


Figura 2. Teste da Acriflavina. (A) Reação negativa. (B) Reação positiva flocular entre a solução bacteriana contendo cepas de *P. multocida* do tipo D e a solução de acriflavina.

As figuras 3, 4, 5 e 6 apresentam eletroforese em gel de agarose com os produtos de amplificação esperados para cada gene de virulência nos quatro protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos e os produtos de amplificação esperados para cada gene de virulência.

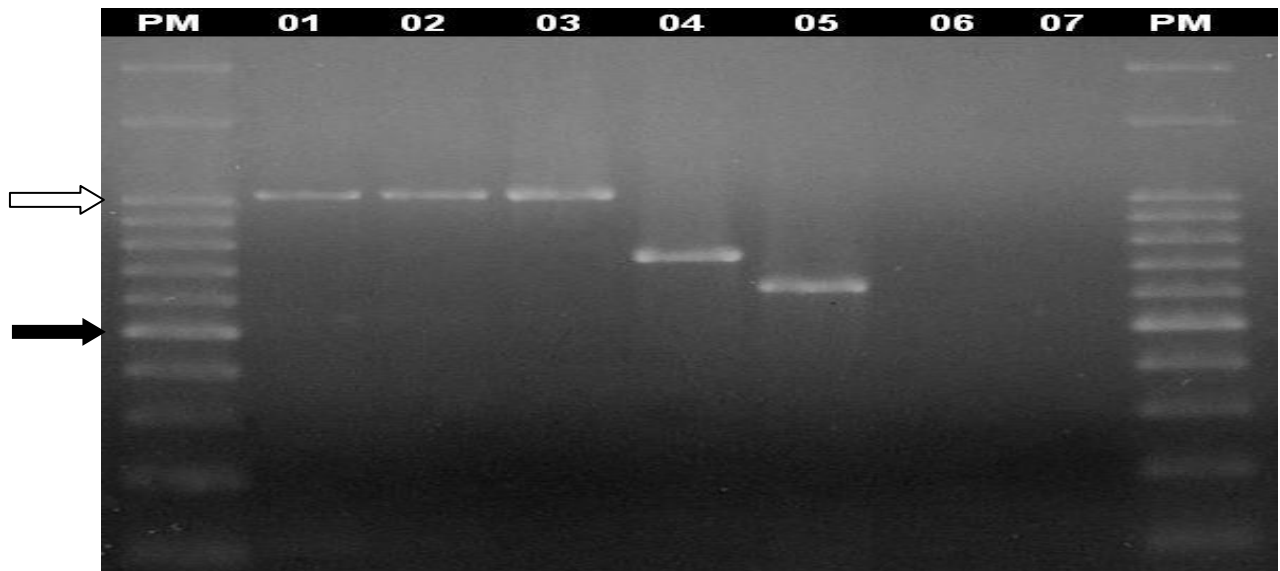


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex1): *hyaD-hyaC* (1044pb), *bcbD* (760pb), *dcfF* (657pb). Legenda: PM= marcador de peso molecular (100pb); 01 e 02= amostras; 03= *P. multocida* ATCC 12945; 04= *P. multocida* ATCC 12946; 05= *P. multocida* TOX; 06= *M. haemolytica* ATCC 29694, 07= controle da reação. A seta preenchida indica fragmento de 500pb e a seta branca indica fragmento de 1000pb.

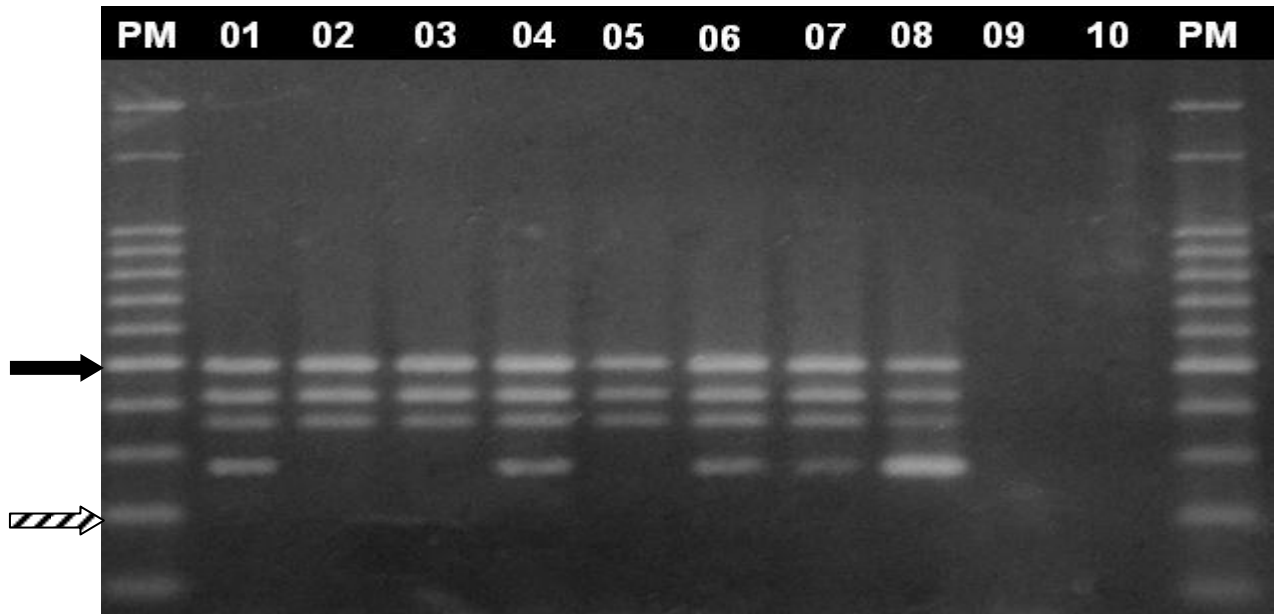


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex2): *ptfA* (488pb); *hgbA* (419pb); *sodA* (361pb); *pfhA* (275pb). Legenda: PM= marcador de peso molecular (100pb); 01 a 07= amostras; 08= *P. multocida* ATCC 12945; 09= *M. haemolytica* ATCC 29694, 10= controle da reação. A seta tracejada indica fragmento de 200pb, a seta preenchida indica fragmento de 500pb.

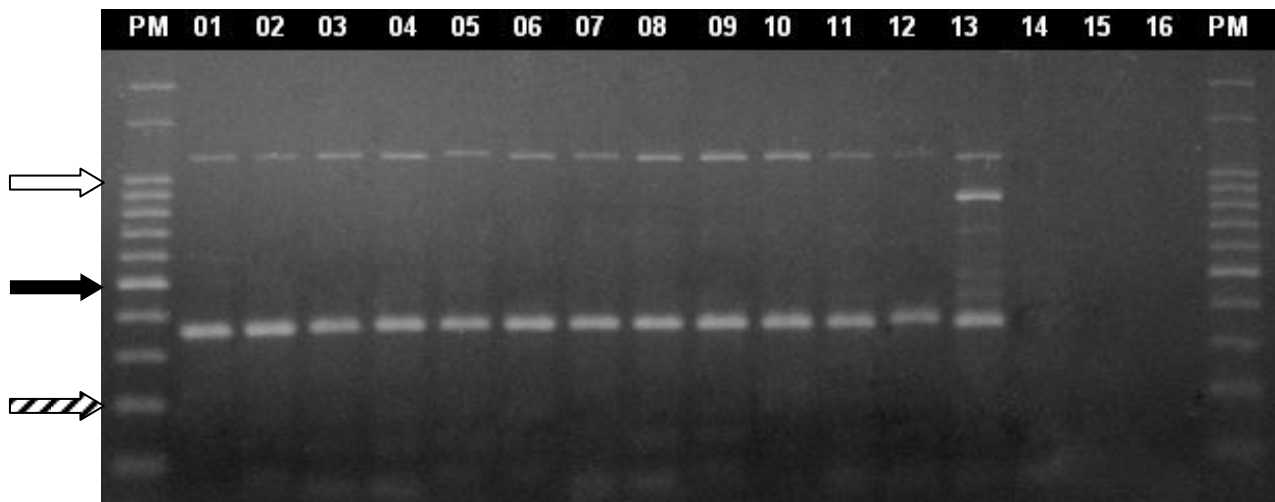


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex3): *exBD-tonB* (1144pb); *toxA* (865pb), *nanH* (360pb). Legenda: PM= marcador de peso molecular (100pb); 01 a 12= amostras; 13= *P. multocida* TOX; 14= *R. anatipestier* ATCC 11845; 15= *M. haemolytica* ATCC 29694, 16= controle da reação. A seta tracejada indica fragmento de 200pb, a seta preenchida indica fragmento de 500pb e a seta branca indica fragmento de 1000pb.

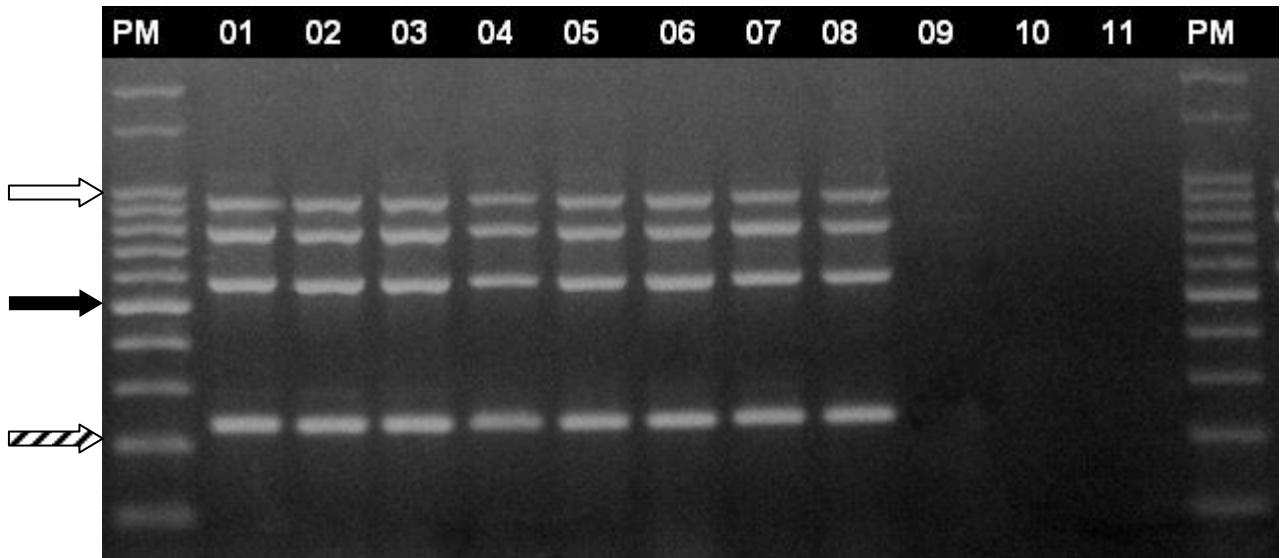


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com os produtos de amplificação compatíveis com os genes pesquisados (Multiplex4): *oma87* (948pb); *hgbB* (788pb); *nanB* (554pb); *sodC* (235pb). Legenda: PM= marcador de peso molecular (100pb); 01 a 07= amostras; 08= *P. multocida* ATCC 12945; 09= *R. anatipestier* ATCC 11845; 10= *M. haemolytica* ATCC 29694, 11= controle da reação. A seta tracejada indica fragmento de 200pb, a seta preenchida indica fragmento de 500pb e a seta branca indica fragmento de 1000pb.

5. DISCUSSÃO

Apesar da importância econômica da infecção causada por *Pasteurella multocida*, os mecanismos pelo qual este agente ocasiona diferentes doenças são ainda pouco esclarecidos (HARPER *et al.*, 2006). A alta variabilidade antigênica, os diversos hospedeiros e os diferentes cursos de infecção dificultam, por exemplo, o estabelecimento de uma vacina eficiente (DAVIES *et al.*, 2003). O sequenciamento de regiões da cápsula (CHUNG *et al.*, 1998) e do genoma completo de um isolado de Cólera Aviária (MAY *et al.*, 2001) permitiu a identificação de genes possivelmente associados à virulência, representando um primeiro passo para esclarecer os mecanismos moleculares que envolvem a patogenia desta bactéria.

Por outro lado, ainda são poucos os trabalhos que têm como objetivo a detecção, a determinação da frequência e de padrões genéticos de virulência (EWERS *et al.*, 2006; ATASHPAZ, *et al.*, 2009; BETHE *et al.*, 2009; SHAYEGH *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009). Estes dados tornam-se ainda mais escassos quando relacionados às amostras isoladas em aves. A exceção são os diversos estudos que buscam a caracterização molecular dos tipos capsulares de *P. multocida* a partir da utilização de multiplex-PCR (TOWNSEND *et al.*, 2001; DZIVA *et al.*, 2004; ZAGLIC *et al.*, 2005; JABBARI *et al.*, 2006; LEOTTA *et al.*, 2006; SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; SHIVACHANDRA *et al.*, 2008; BETHE *et al.*, 2009).

A cápsula é o principal fator de virulência identificado em *P. multocida* (HARPER *et al.*, 2006), e sugere-se uma possível inter-relação entre o tipo capsular, a patogenia e a predisposição do hospedeiro a um sorogrupo particular (CHUNG *et al.*, 1998). O sorogrupo A foi identificado em 24 das 25 amostras isoladas em aves através do multiplex-PCR. Os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos de Leotta *et al.* (2006) que obtiveram o mesmo resultado em 8 de 9 amostras isoladas de aves na Argentina. Da mesma forma, Shivachandra *et al.* (2006) identificaram 92 cepas pertencentes ao tipo A dentre 94 isolados de galinhas na Índia e Jabbari *et al.* (2006) classificaram todas as 35 amostras iranianas como pertencentes ao tipo A. Este tipo é considerado predominante em aves (RHOADES; RIMLER, 1989).

Nenhuma amostra foi classificada nos tipos capsulares B e D, os quais também estão presentes em aves, assim como o F. A ocorrência destes tipos capsulares é considerada rara (GLISSON, 2008). No estudo de Davies *et al.* (2003) somente 8% das amostras isoladas em aves foram pertencentes ao tipo B, 5% ao sorogrupo D e 4% ao tipo F.

Uma amostra não foi identificada através do multiplex-PCR 01 adaptado a partir do protocolo desenvolvido por Townsend *et al.* (2001). Os autores deste trabalho consideram que entre 2 a 5% das cepas não são tipificáveis. Em outros estudos similares, entre 2 a 9% das amostras não foram classificadas (DZIVA *et al.*, 2004; JAMALUDIN *et al.*, 2005, LEOTTA *et al.*, 2006). Uma análise possível neste caso seria a avaliação da presença de uma cepa não capsulada através de microscopia eletrônica (DAVIES *et al.*, 2003), pois esta mesma amostra não foi identificada pelos testes não-sorológicos utilizados. Outra possibilidade seria este isolado pertencer ao sorogrupo F, para o qual não houve análise no atual trabalho.

Além da relação específica de certos sorogrupos de *P. multocida* a determinadas doenças e espécies, também existe uma distribuição geográfica dominante dos tipos capsulares (ZAGLIC *et al.*, 2005). Contudo, estas relações têm apresentado variações nos últimos anos. Exemplos são o aumento dos casos de pneumonia em suínos causadas pelo tipo capsular D, que antigamente eram associadas ao sorogrupo A (BOROWSKI, 2007), ou o alastramento dos casos de septicemia hemorrágica em bovinos associados ao sorogrupo B:2, anteriormente concentrado apenas no sudeste asiático (KHAN *et al.*, 2011). Da mesma forma, a cápsula do tipo F, inicialmente relacionada às aves, tem sido identificada em outros hospedeiros, como em suínos e em coelhos que apresentavam doenças respiratórias (DAVIES *et al.*, 2004; JAGLIC *et al.*, 2004). Trabalhos futuros com um maior número de amostras isoladas de casos de CA de diferentes regiões do país poderiam também demonstrar esta variação entre as aves. Estas amostras também poderiam ser tipificadas através de ribotipagem (ZAGLIC *et al.*, 2005), REP-PCR (SELLYEI *et al.*, 2008) ou MLST (SUBAAHARAN. *et al.*, 2010), assim filogeneticamente comparando-se isolados de hospedeiros diferentes em um mesmo ambiente ou amostras originárias de diversos surtos.

A comparação entre os testes convencionais não sorológicos e o método molecular de determinação capsular apresentou importante variação na capacidade de tipificação, pois enquanto nove amostras (36%) das 25 de origem aviária não foram identificadas pelo teste convencional, somente uma amostra (8%) não foi tipificada através do multiplex-PCR. A menor capacidade de determinação da cápsula através do teste convencional também foi encontrada em outros estudos (TOWNSEND *et al.*, 2001; EWERS *et al.*, 2006; SHIVACHANDRA *et al.*, 2006; ARUMUGAN *et al.*, 2011). Após o advento da técnica de PCR desenvolvida por Townsend *et al.* (2001), o método molecular passou a ser considerada por alguns autores a técnica padrão ouro para a tipificação capsular em substituição aos testes fenotípicos, especialmente a hemaglutinação passiva (DZIVA *et al.*, 2008). Não foram encontradas classificações divergentes entre as duas metodologias, ao contrário de outros estudos, e o resultado do coeficiente Kappa encontrado foi considerado aceitável (EWERS *et al.*, 2006; ARUMUGAN *et al.*, 2011).

A falha na aglutinação dos sorogrupos A, D e F com antissoros homólogos é uma dos grandes empecilhos à sensibilidade do teste fenotípico (JABBARI *et al.*, 2006). Outra questão importante é que o teste de hemaglutinação passiva desenvolvido por Carter (1955) pode tornar-se inábil devido à perda da cápsula de *P. multocida* depois de repetidos cultivos em laboratório (DZIVA *et al.*, 2008).

No trabalho desenvolvido por Shivachandra *et al.* (2006), comparando-se os dois métodos, 16% dos 123 isolados de galinhas, perus, codornas, patos e gansos não foram identificados através dos testes convencionais, enquanto que todas as amostras foram tipificadas através do multiplex-PCR. No mesmo contexto, Arumugan *et al.* (2011) obtiveram 48% de cepas não tipificáveis através dos testes da hialuronidase, da acriflavina e com o uso de antissoros específicos para identificação das cápsulas do tipo A, D e B, respectivamente.

A composição química semelhante dos polissacarídeos que compõem a cápsula pode interferir na especificidade do teste (EWERS *et al.*, 2006). A dificuldade em obter antissoros específicos para cada tipo capsular, assim como a necessidade de identificação e tipificação de isolados de campo nos estágios iniciais da infecção ou antes do desenvolvimento de vacinas homólogas eficientes ao desafio de CA são justificativas importantes para se utilizar a PCR (SHIVACHANDRA *et al.*, 2006, DZIVA *et al.*, 2008).

Os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos apresentaram os mesmos resultados dos protocolos individuais, o que representa um importante passo para o diagnóstico e estudo de um maior número de amostras de *P. multocida*. O multiplex-PCR permite a detecção de múltiplos genes de virulência, reduzindo-se a quantidade de reagentes utilizados e o tempo necessário para obtenção dos resultados (MARKOULATOS *et al.*, 2002; PERRY *et al.*, 2007).

Com exceção aos trabalhos que buscam a tipagem molecular das cápsulas de *Pasteurella multocida*, raros são os exemplos de estudos desenvolvidos para a detecção múltipla de genes de virulência com esta bactéria. Citam-se como exemplo na literatura somente três trabalhos restritos a amostras de ruminantes que selecionaram apenas 04 genes de virulência (*pfhA*, *tbpA*, *toxA* e *hgbB*) (SHAYEGH *et al.*, 2008; SHAYEGH *et al.*, 2009; ATASHPAZ *et al.*, 2009).

Os protocolos de PCR individuais e de multiplex-PCR também foram viáveis na detecção dos genes de virulência em amostras de origem suína. A viabilidade na utilização de protocolos individuais foi também demonstrada por Ewers *et al.* (2006) que trabalharam com 9 diferentes origens de isolamento, incluindo-se a espécie humana. Entretanto, a utilização de multiplex-PCR com cepas obtidas de diferentes espécies restringe-se ao estudo de Atashpaz *et al.* (2009) que trabalharam com amostra isoladas de diferentes ruminantes (ovinos, bovinos e búfalos).

Com relação aos genes *ompH* e *oma87*, codificadores de porinas da *P. multocida*, a detecção em 100% das amostras analisadas está de acordo com outros trabalhos que apresentaram o mesmo resultado (DAVIES *et al.*, 2004; EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009). Da mesma forma, ratificam-se as porinas como candidatas ao desenvolvimento de vacinas heterólogas, pois são geralmente conservadas entre as espécies e altamente imunogênicas. A imunogenicidade está relacionada aos domínios da estrutura secundária de OmpH e Oma87 que formam porções hidrofílicas expostas na superfície bacteriana e que atuam como epítomos (LEE *et al.*, 2007). Esta possibilidade de proteção em respostas imunes cruzadas apresentou maior relevância após observar-se que o uso de LPS purificado de *P. multocida* apresenta apenas proteção parcial em camundongos inoculados experimentalmente (RYU; KIM, 2000).

OmpH e Oma87 purificadas ou amplicons dos seus genes também podem ser selecionados para avaliar diferenças intra-espécies e determinar relações epidemiológicas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis*) e técnicas de tipagem molecular. Como exemplo, Davies *et al.* (2003) classificaram 100 amostras de *P. multocida* isoladas de aves na Inglaterra em 19 perfis a partir da diferença de peso molecular das porinas. A alta diversidade de perfis estaria relacionada com a variação de sinais clínicos e lesões característica da infecção por *P. multocida* (DAVIES *et al.*, 2003).

Todas as amostras de aves apresentaram o gene *sodC*, e somente uma foi negativa para o gene *sodA*. As enzimas com função antioxidante codificadas por estes genes somente foram descritas após o sequenciamento do genoma da amostra Pm70 em 2001 (MAY *et al.*, 2001). Os resultados são semelhantes aos encontrados na Alemanha por Ewers *et al.* (2006) que detectaram a presença dos dois genes em 100% das 289 cepas de *P. multocida* isoladas de diferentes espécies, incluindo-se 20 amostras de galinhas.

Alguns trabalhos sugerem a utilização de *primers* internos que correspondam a 80% dos genes *sodC* e *sodA*, com posterior realização de PCR direto da colônia e sequenciamento, para a distinção do gênero *Pasteurella* (GAUTIER *et al.*, 2005; CATTOIR *et al.*, 2006). Este procedimento poderia ter maior poder discriminatório do que a análise do rRNA 16S e é utilizado em outros microrganismos, como *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* (GAUTIER *et al.*, 2005).

Entre os três genes envolvidos com o metabolismo do ferro selecionados para estudo, todos estavam presentes nas 25 amostras de origem aviária. Os resultados encontrados para *exBD-tonB* e *hgbA* estão de acordo com trabalhos anteriores (EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009). O complexo TonB, composto por três proteínas, é responsável pela força próton motiva necessária para internalizar o ferro no espaço periplasmático (KREWULAK *et al.*, 2008). Como a energia gerada pelo complexo é necessária para os diferentes mecanismos de captação de ferro (HATFALUDI *et al.*, 2010), a frequência normalmente esperada dos genes codificadores das proteínas do complexo é de 100% (BETHE *et al.*, 2009).

A HgbA corresponde a uma dos exemplos de proteínas presentes na membrana externa da bactéria que se ligam a glicoproteínas do hospedeiro que apresentam uma fonte

de ferro, a qual neste caso é a hemoglobina (BOYCE *et al.*, 2010). Devido à alta prevalência e ao relevante papel desempenhado na virulência de *P. multocida*, o gene *hgbA* é considerado um candidato para o desenvolvimento de vacinas heterólogas eficientes (EWERS *et al.*, 2006), assim como foi observado em outros membros da família *Pasteurellaceae* (POTTER *et al.*, 1999). A frequência encontrada para o gene *hgbB* nas amostras isoladas de aves foi superior aos 85% encontrado por Ewers *et al.* (2006), único trabalho que pesquisou a presença de *hgbB* neste hospedeiro.

Por outro lado, este gene somente foi detectado em 2 das 6 amostras de suínos com casos de pneumonia (33%) utilizadas para avaliar a compatibilidade dos protocolos de PCR em diferentes espécies. Semelhante resultado foi encontrado por Bethe *et al.* (2009) que detectaram o gene *hgbB* em menor frequência em animais doentes do que em sadios. Shayegh *et al.* (2008) apresentaram resultado idêntico analisando amostras de ovinos clinicamente saudáveis e de ovinos com sinais respiratórios. Em ambas as situações, acredita-se não haver correlação entre a presença do gene *hgbB* e patologias causadas por *P. multocida* nestas espécies. Obviamente um maior número de amostras, inclusive isoladas de animais sadios, é necessário para avaliar esta tendência.

As sialidases são enzimas que removem o ácido siálico conjugado a glicoproteínas e a glicolipídeos das células eucarióticas (HATFALUDI *et al.*, 2010). O ácido siálico é utilizado como fonte de carbono para o metabolismo bacteriano ou também incorporado à membrana externa, auxiliando no processo infeccioso e na inibição do sistema imune do hospedeiro (VIMR; LITCHTENSTEIGER, 2002). Em relação aos genes codificadores das sialidases, o gene *nanB* foi identificado nas 25 amostras (100%), e o *nanH* em 24 (96%). O gene *nanB* também foi detectado em todas as amostras estudadas em outros trabalhos (MIZAN *et al.*, 2000; EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009). O resultado obtido na pesquisa do gene *nanH* foi semelhante ao apresentado por Bethe *et al.* (2009) porém diferente do trabalho de Ewers *et al.* (2006) que o detectaram em 65% das amostras.

Além do catabolismo promovido pelas sialidases, a *P. multocida* apresenta a capacidade de codificar o ácido siálico. Sugere-se que esta codificação ocorra no mesmo *operon* em que se encontram os genes *nanH* e *nanB* (STEENBERGEN *et al.*, 2005). Assim, a expressão dos genes relacionados à biossíntese e ao catabolismo do ácido siálico é

variável de acordo com a flutuação do ácido siálico no ambiente em que se encontra a bactéria (VIMR; LITCHTENSTEIGER, 2002).

A adesão bacteriana à célula hospedeira corresponde a um pré-requisito básico no início do processo infeccioso, e por esta razão os genes envolvidos nesta etapa são alvo constante das análises dos genótipos de virulência de *P. multocida* (HATFALUDI *et al.*, 2010). Acredita-se que entre as adesinas *pfhA*, *tad*, *ptfA*, *fimA*, *hsf-1,2* identificadas em amostras de *P. multocida*, somente as três últimas estão presentes em todas as cepas consideradas patogênicas (SELLYEI *et al.*, 2010).

O gene *ptfA*, que codifica uma subunidade da fímbria do tipo IV, foi encontrado em 23 amostras (92%) no atual trabalho, resultado similar ao encontrado em outros estudos (EWERS *et al.*, 2006; BETHE *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009). A fímbria do tipo IV é formada por repetidas subunidades codificadas por *ptfA* e apresenta uma sequência nucleotídica N-terminal altamente conservada (HATFALUDI *et al.*, 2010).

Em recente estudo, Sellyei *et al.* (2010) identificaram somente dois principais alelos do gene *ptfA* presentes entre 31 cepas de diferentes sorotipos e sorogrupos isoladas de aves. Os alelos também estão correlacionados com as amostras de acordo com a severidade dos casos de CA. Por estas características, apesar das variações de imunogenicidade observadas de acordo com a cepa de *P. multocida* por Doughty *et al.* (2000), este gene também é sugerido como um possível candidato ao desenvolvimento de vacinas heterólogas (EWERS *et al.*, 2006).

Já a hemaglutinina *pfhA*, foi identificada em 15 amostras (60%) das 25 analisadas. Esta menor frequência também foi encontrada em outros trabalhos. Ewers *et al.* (2006) detectaram *pfhA* em 45% das 20 amostras de galinhas analisadas. Os mesmos autores observaram uma variação entre 7 e 100% na frequência do gene de acordo com a espécie estudada e correlacionaram a sua presença à ocorrência de pasteurelose em bovinos. Bethe *et al.* (2009) fizeram a mesma correlação do gene com a ocorrência de doença respiratória em suínos. Por outro lado, Shayegh *et al.* (2008) detectaram um percentual baixo de 18% de *pfhA* entre ovinos e não encontraram relação da presença do gene com a doença nesta espécie.

Outra correlação em que não existe divergência entre os estudos é quanto à presença majoritária do gene *pfhA* nas amostras capsulares do tipo A. Em trabalho com 233 amostras

de *P. multocida* isoladas de casos respiratórios em suínos na China, Tang *et al.* (2009) detectaram a presença de *pfhA* em 25% das cepas do sorogrupo A e em somente 3,1% das amostras do tipo D. Resultados semelhantes foram obtidos por Ewers *et al.* (2006) analisando 289 amostras de *P. multocida* isoladas de diversas espécies. A associação entre o gene *pfhA* e o gene da cápsula do tipo A não é física, uma vez que estão separados por uma região de 839 kb no genoma da amostra Pm70 (MAY *et al.*, 2001). Acredita-se que o gene *pfhA* tenha sido adquirido por alguns clones através de transferência horizontal, assim obtendo vantagem na sobrevivência no hospedeiro. Entretanto, a razão pela qual esta aquisição ocorre mais em cepas do tipo A não está esclarecida (BETHE *et al.*, 2009).

Além da adesão, o gene *pfhA* também é considerado um fator de resistência no soro, pois apresenta similaridade da sua sequência de aminoácidos com a proteína p76 de mesma função e encontrada em *Haemophilus somnus* (COLE *et al.*, 1993). Da mesma forma, a proteína codificada por *pfhA* apresenta significativa similaridade com a proteína hemaglutinante FHA presente em *Bordetella pertussis*. FHA possui importante papel na colonização do trato respiratório superior dos hospedeiros (KNIGHT *et al.*, 2006).

Nenhuma das 25 amostras de *P. multocida* de origem aviária analisadas neste trabalho apresentou o gene *toxA*. Ewers *et al.* (2006) também encontraram uma baixa frequência deste gene, que só foi detectado em 5% das cepas isoladas de aves. Por outro lado, Rhoades e Rimler (1990) detectaram frequência de 100% em cepas toxigênicas de perus, espécie aviária em que mais comumente se relata a presença do gene *toxA*. Apesar de a presença do gene *toxA* estar principalmente relacionada a amostras do sorogrupo D isoladas em casos de rinite atrófica progressiva em suínos (DZIVA *et al.*, 2004), outros trabalhos o detectaram majoritariamente em cepas do sorogrupo A e em diferentes hospedeiros (ZAGLIC *et al.*, 2005), inclusive no homem (DONNIO *et al.*, 1991, DONNIO *et al.*, 1999).

Neste contexto, Ewers *et al.* (2006) detectaram o gene *toxA* em 66,7% das amostras de *P. multocida* isoladas de pequenos ruminantes e em 6% das amostras de bovinos. Da mesma forma, Shayegh *et al.* (2008) detectaram o gene em 70% das cepas isoladas em ovinos doentes, mas em nenhuma ovelha saudável. Em 2009, os mesmos autores identificaram cepas toxigênicas de *P. multocida* em caprinos com sintomatologia respiratória. A presença do gene *toxA* estaria associada aos casos de pneumonia nestas duas

espécies, assim como à rinite atrófica em suínos (SHAYEGH *et al.*, 2009). Esta relação não é citada em aves.

No experimento foram obtidos seis diferentes perfis genéticos entre as 25 amostras de origem aviária, sendo P1 (negativo para os genes *toxA*, *dcbF* e *bcbD*) o mais comum, seguido de P2 (negativo para os genes *toxA*, *phA*, *dcbF*, *bcbD*) e P3 (negativo para *toxA*, *ptfA*, *dcbF*, *bcbD*). Os perfis P4 (negativo para *toxA*, *nanH*, *dcbF*, *bcbD*), P5 (negativo para *toxA*, *pfhA*, *sodA*, *dcbF*, *bcbD*) e P6 (negativo para *toxA*, *pfhA*, *sodA*, *hyad-hyaC*, *dcbF*, *bcbD*) apresentaram apenas uma amostra para cada. Como todas as cepas foram isoladas de casos clínicos de CA, possivelmente tratam-se de amostras mais virulentas. Desta forma, esperava-se que a maioria das amostras apresentasse uma alta frequência entre todos os genes estudados, assim como a diferenciação dos perfis de acordo com o tipo capsular. Dentre as amostras de suínos utilizadas para avaliar a compatibilidade dos protocolos de PCR, quatro delas apresentaram perfis diferentes (P7 e P8) devido à ausência dos genes *hgbB* e *pfhA*.

Esta distribuição das amostras em perfis genéticos realiza uma análise qualitativa dos resultados, considerando apenas a presença ou ausência dos genes e estabelecendo uma relação linear entre as amostras. Entretanto, esta relação pode não ser verdadeira, já que a expressão dos genes e a interação entre eles não está sendo considerada. Por esta razão, é importante ressaltar que a análise quantitativa da expressão destes genes deve ser observada, pois resulta em um fenótipo de maior ou menor virulência da amostra. Os estudos mais recentes utilizam-se da técnica de microarranjo do DNA para analisar a expressão simultânea de inúmeros genes de *P. multocida in vitro* de acordo com a restrição de nutrientes como o ferro ou da adição de antimicrobianos ao meio (BOYCE; ADLER, 2006; MELNIKOW *et al.*, 2008).

A confirmação da distribuição dos genes de virulência encontrada neste trabalho em um número maior de amostras isoladas em aves, assim como a obtenção de cepas de diferentes origens são as próximas etapas a serem realizadas em trabalhos futuros. O estudo de amostras isoladas de grupos de animais sadios e de doentes também poderá elucidar uma possível relação epidemiológica entre um determinado grupo de genes e o desenvolvimento de CA em casos agudos ou crônicos. Os genes *toxA*, *tbpA* e *pfhA* são descritos como

marcadores do potencial patogênico de isolados de *P. multocida* em ruminantes e suínos (SHAYEGH *et al.*, 2008; BETHE *et al.*, 2009).

Da mesma forma, a obtenção de amostras isoladas em outros hospedeiros (ruminantes, suínos, *pets*) e a comparação dos perfis genéticos é interessante, pois alguns estudos que caracterizam e relacionam genotipicamente cepas isoladas de diferentes espécies citam a possibilidade de transmissão horizontal de genes de virulência entre elas (DAVIES *et al.*, 2004; BETHE *et al.*, 2009).

Apesar da relação de genes de virulência descrita em *P. multocida* não ser muito extensa, outros genes relacionados à resistência antimicrobiana, à captação de ferro e à biossíntese de LPS são importantes e podem auxiliar no estudo da virulência de *P. multocida*. Como exemplo, a presença do gene *tbpA*, o qual é envolvido no metabolismo do ferro e ainda não foi detectado em aves, tem sido associada a pasteurelose em outros hospedeiros (EWERS *et al.*, 2006).

O estudo da frequência dos genes em um maior número de amostras, relacionando-se os resultados obtidos com os testes fenotípicos representa um próximo passo para a realização de experimentos *in vivo*, possivelmente em camundongos. A avaliação do potencial patogênico de uma amostra a partir da associação de diferentes parâmetros (testes bioquímicos, resistência antimicrobiana e índice de patogenicidade) já é realizada em outra importante linha de pesquisa do CDPA que estuda *E. coli*, bactéria também comumente isolada de animais saudáveis ou envolvida em patologias.

6. CONCLUSÕES

1. Todos os protocolos de PCR utilizados foram viáveis e específicos na detecção dos 15 genes de virulência.
2. Os protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos apresentaram os mesmos resultados dos protocolos individuais, tornando-se uma ferramenta bastante útil para a detecção simultânea dos genes de virulência em estudos futuros com um maior número de amostras.
3. As duas metodologias foram capazes de detectar os genes pesquisados tanto em amostras isoladas de aves, quanto naquelas de suínos.
4. A multiplex-PCR é uma alternativa rápida e eficaz para a identificação capsular de isolados de *Pasteurella multocida* quando comparada aos testes fenotípicos, pois observou-se uma maior capacidade de tipificação.
5. Apesar da alta frequência dos genes estudados, compatível com estudos anteriores, e de todas as amostras pertencerem à mesma subespécie de *P. multocida*, foram observados seis diferentes perfis genéticos em amostras de aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALTMAN, D.G.; BLAND, J.M. Diagnostic tests 2: predictive values. **British Medical Journal**, v.309, 1994. p.102

ARUMUGAM, N.D.; AJAM, N.; BLACKALL, P.J.; ASIAH, N.M.; RAMLAN, M.; MARIA, J.; YUSLAN, S.; THONG, K.L Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts – a comparison of phenotypic and genotypic methods. **Tropical Biomedicine**, v.28, n.1, 2011. p.55-63

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

BACK, A. Coriza Infecciosa. **Manual de Doenças de Aves**.1.ed. Cascavel: Coluna do Saber, 2004. p.31-33

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

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

BOERLIN, P.; SIEGRIST, H.H.; BURNENS, A.P.; KUHNERT, P.; MENDEZ, P.; PRÉTAT, G. ; LIENHARD, R. ; NICOLET, J. Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, 2000. p.1235-1237

BOJESEN, A.M.; PETERSEN, K.D.; NIELSEN, O.L.; CHRISTENSEN, J.P.;

BISGAARD, M. *Pasteurella multocida* infections in heterophil-depleted chickens. **Avian Disease**, v.48, 2004. p.463-470

BOROWSKI, S.M. **Tese de Doutorado:** Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2001.

BOROWSKI, S.M.; SILVA, S.C.; SCHRANK, I.; CARDOSO, M. Toxin detection in *Pasteurella multocida* strains isolated from swine lungs in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.29, n.2, 2001. p.79-85

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

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

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

BOYCE, J.D.; CHUNG, J.Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. **Journal of Biotechnology**, v.83, 2000b. p153-160

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

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

BOSCH, M.; TARRAGÓ, R.; GARRIDO, E.; CAMPOY, S.; HENESTROSA, A.R.F.; ROZAS, A.M.P.; BADIOLA, I.; BARBÉ, J. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the fur protein. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, 2001. p.35-40

BOSCH, M.; GARRIDO, E.; LIAGOSTERA, M.; ROZAS, A.M.P.; BADIOLA, I.; BARBÉ, J. *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. **FEMS Microbiology Letters**, v.210, 2002. p.201-208

BOSCH, M.; GARRIDO, E.; ROZAS, A.M.P.; BADIOLA, I.; BARBÉ, J.; LIAGOSTERA, M. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. **Veterinary Microbiology**, v.99, 2004. p.103-111

BRINGHENTI, J.D.M. **Dissertação de Mestrado**: Aplicação de um protocolo de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para detecção da *Pasteurella multocida* isoladas de aves. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2010.

CAPITINI, C.M.; HERRERO, I.A.; PATEL, R.; ISHITANI, M.B.; BOYCE, T.G. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in child who sustained a tiger bite. **Clinical Infectious Disease**, v.34, 2002. p.74-76

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

- CARTER, G.R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* using acriflavine. **American Journal Veterinary Research**, v.34, 1973. p.293-295
- CARTER, G.R.; RUNDELL, S.W. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **Veterinary Records**, v.96, 1975. p.343
- CATTOIR, V.; LEMENAND, O.; AVRIL, J.L.; GAILLOT, O. The *sodA* gene as a target for phylogenetic dissection of the genus *Haemophilus* and accurate identification of human clinical isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, 2006. p.531-540
- CHAMBERLAIN, J.S.; GIBBS, R.A.; RANIER, J.E.; NGUYEN, P.N.; CASKEY, C.T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v.16, 1988. p.11141-11156
- CHARLTON, B.R.; BERMUDEZ, A.J.; BOULIANNE, M.; HALVORSON, D.A.; SCHRADER, J.S.; NEWMAN, L.J.; SANDER, J.E.; WAKENELL, P.S. Fowl cholera. **Avian Disease Manual**. 6.ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, 2006. p.84-87
- CHOI-KIMA, K.; MAHESWARAN, S.K.; FELICE, L.J.; MOLITORC, T.W. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v.28, n.1, 1991. p.75-92
- CHRISTENSEN, J.P.; DIETZ, H.H.; BISGAARD, M. Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from back-yard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna Denmark. **Avian Pathology**, v.27, 1998. p.373-381
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. The genus *Pasteurella*. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3.ed. New York: Springer, 2006. p.1062-1090
- CHRISTENSEN, J.P.; KUHNERT, P.; BUSSE, H.J.; FREDERIKSEN, W.C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera species and

- subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, 2007. p.166-178
- CHUNG, J.Y.; ZHANG, Y.; ADLER, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. **FEMS Microbiology Letters**, v.166, 1998. p.289-296
- CHUNG, J.Y.; WILKIE, I.; BOYCE, J.D.; TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J.; GHODDUSI, M.; ADLER, B. Role of capsule in the pathogenesis of Fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. **American Society for Microbiology**, v.64, n.4, 2001. p.2487-2492
- COLE, S.P.; GUINEY, D.G.; CORBEIL, L.B. Molecular analysis of a gene encoding a serum-resistance-associated 76 kDa surface antigen of *Haemophilus somnus*. **Journal of General Microbiology**, v.114, 1993. p.304-317
- CORNEY, B.G.; DIALLO, I.S.; WRIGHT, L.L.; HEWITSON, G.R.; DE JONG, A.J.; BURRELL, P.C.; DUFFY, P.F.; STEPHENS, C.P.; BOYLE, D.B.; BLACKALL, P.J. *Pasteurella multocida* detection by 5' *Taq* nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, 2007. p.376-380
- COX, A.J.; HUNT, M.L.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. **Microbial Pathogenesis**, v.34, 2003. p.287-296
- DAVIES, R.L.; MACCORQUODALE, R.; CAFFREY, B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. **Veterinary Microbiology**, v.91, 2003. p.169-182
- DAVIES, R.L.; MacCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. **Veterinary Microbiology**, v.99, 2004. p.145-158

DeANGELIS, P.L.; GUNAY, N.S.; TOIDA, T.; MAO, W.; LINHARDT, R.J.

Identification of the capsular polysaccharides of type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. **Carbohydrate Research**, v.337, 2002. p.1547-1552

DONNIO, P.Y.; AVRIL, J.L.; ANDRE, P.M.; VAUCEL, J. Dermonecrotic toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from man. **Journal of Medical Microbiology**, v.34, 1991. p.333-337

DONNIO, P.Y, ALLARDET-SERVENT, A.; PERRIN, M.; ESCANDE, F.; AVRIL, J.L. Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida subsp. multocida* isolated from man and swine. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, 1999. p.125-131

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

DZIVA, F.; CHRISTENSEN, H.; VAN LEENGOED, L.A.M.G.; 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**, v.102, 2004. p.117-122

DZIVA, F.; MUHAIRWA, A.P.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Diagnostic and typing options for investigation of disease associated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v.128, 2008. p.1-22

EWERS, C.; LÜBKE-BECKER, A.; BETHE, A.; KIEBLING, S.; FILTER, M.; WIELER, L.H. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v.114, 2006. p.304-317

- FÁTIMA, A.; BAPTISTELLA, L.H.B.; PILLI, R.A. Ácidos siálicos – da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente infeccioso da gripe. **Química Nova**, v.28, n.2, 2005. p.306-316
- FEGAN, N.; BLACKALL, P.J.; PAHOFF, J.L. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. **Veterinary Microbiology**, v.47, 1995. p.281-286
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v.201, 1978. p.875-880
- FULLER, T.W.; KENNEDY, M.J.; LOWERY, D.E. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. **Microbial Pathogenesis**, v.29, 2000. p.25-38
- GAUTIER, A.L.; DUBOIS, D.; ESCANDE, F.; AVRIL, J.L.; CUOT-TRIEU, P.; GAILLOT, O. Rapid and accurate identification of Human Isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, 2005. p.2307-2314
- GAUTAM, R.; KUMAR, A.A.; SINGH, V.P.; SINGH, V.P.; T;K; DUTTA, S.B., SHIVACHANDRA, S.B. Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. **Research in Veterinary Science**, v.76, 2004. p.179-185
- GERARDO, S.H.; CITRON, D.M.; CLAROS, M.C.; FERNANDEZ, H.T.; GOLDSTEIN, E.J.C. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and α -glucosidase activity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.7, 2001. p.2558-2564
- GLISSON, J.R.; HOFACRE, C.L.; CHRISTENSEN, H. Fowl cholera. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 11.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2003. p.658-676

GLISSON, J.R. Pasteurellosis and others respiratory bacterial infection. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p.739-758

GLISSON, J.R.; SANDHU, T.S.; HOFACRE, C.L. Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, riemerellosis and pseudotuberculosis. In: DUFOUR-ZAVALA, L. (Ed.). **A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens**. 5.ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, 2008. p.12-18

GUENTHER, S.; SCHIERACK, P.; GROBBEL, M.; BECKER, A.L.; WIELER, L.H.; EWERS, C. Real-time PCR assay for the detection of species of the genus *Mannheimia*. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, 2008. p.75-80

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Quarta Edição, Nova Iorque, Oxford University Press Inc., 2007.

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

HARPER, M.; BOYCE, J.D.; COX, A.D.; MICHAEL, F.S.; WILKIE, I.W.; BLACKALL, P.J.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* express two lipopolysaccharide glycoforms simultaneously, but only a single form is required for virulence: identification of two acceptor-specific heptosyl I transferase. **Infection and Immunity**, v.75, n.8, 2007a. p.3885-3893

HARPER, M.; COX, A.D.; MICHAEL, F.S.; PARNAS, H.; WILKIE, I.W.; BLACKALL, P.J.; ADLER, B.; BOYCE, J.D. Decoration of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide with phosphocholine is important for virulence. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.20, 2007b. p.7384-7391

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

HEDDLESTON, K.L.; GALLAGHER, J.E.; REBERS, P.A. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. **Avian Disease**, v.16, 1972. p.925-936

HEDDLESTON, K.L.; WATKO, L.P.; REBERS, P.A. Dissociation of fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. **Avian Disease**, v.8, 1964. p.649-657

HOLS, E.; ROLLOF, J., LARSSON, L.; NIELSEN, J.P. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.11, 1992. p.2984-2987

HORADAGODA, N.U.; HODGSON, J.C.; MOON, G.M.; WIJEWARDANA, T.G.; ECKERSALL, P.D. Development of a clinical syndrome resembling hemorrhagic septicemia in the buffalo following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B:2 endotoxin and the role of tumor necrosis factor- α . **Research in Veterinary Science**, v.72, 2002. p.194-200

HUGHES, T.P. The epidemiology of fowl cholera. II. Biological properties of *P. avicida*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.51, 1930. p.225-238

HUNT, M.L.; COX, A.J.; RUFFOLO, C.G.; RAJAKUMAR, K.; ADLER, B. Characterisation of a *Pasteurella multocida* esterase gene which confers a hemolytic phenotype in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v.192, 2000. p.240-256

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

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

JAGLIC, Z.; KUCEROVA, Z.; NEDBALCOVA, K.; HLOZEK, P.; BARTOS, M. Identification of *Pasteurella multocida* serogroup F isolates in rabbits. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, 2004. p.467-469

JAMALUDIN, R.; BLACKALL, P.J.; HANSEN, M.F.; HUMPHREY, S.; STYLES, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.53, n.3, 2005. p.203-207

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

KASTEN, R.W.; CARPENTER, T.E.; SNIPES, K.P.; HIRSH, D.C. Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. **Avian Disease**, v.41, 1997. p.676-682

KAWASHIMA, S.; MATSUKAWA, N.; UEKI, Y.; HATTORI, M.; OJIKI, K. *Pasteurella multocida* meningitis caused by kissing animals: a case report and review of the literature. **Journal of Neurology**, v.257, 2010. p.653-654

KHAN, A.; SALEEMI, M.K.; KHAN, M.Z.; GUL, S.T.; IRFAN, M.; QAMAR, M.S. Hemorrhagic Septicemia in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Calves Under Sub-Tropical Conditions in Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, v.43, n.2, 2011. p.295-302

KHARB, S.; CHARAN, S. Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* B:2 in mice model. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, 2010. p.1181-1187

- KNIGHT, J.B.; HUANG, Y.Y.; HALPERIN, S.A.; ANDERSON, R.; MORRIS, A.; MACMILLAN, A.; JONES, T.; BURT, D.S.; VAN NEST, G.; LEE, S.F. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant filamentous haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.144, 2006. p.543-551
- KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1778, 2008. p.1781-1804
- LAINSON, F.A.; THOMPSON, N. ; ROWE, H.A.; LANGFORD, P.R.; AITCHISON, K.D.; DONACHIE, W.; KROLL, J.S. Occurrence of [copper, zinc]-cofactored superoxide dismutase in *Pasteurella haemolytica* and its serotype distribution, v.142, 1996. p.11-17
- LAX, A.J.; CHANTER, N. Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. **Journal of General Microbiology**, v.136, 1990. p.81-87
- 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 infections. **Veterinary Microbiology**, v.72, 2000. p.47-55
- LEE, J.; KIM, Y.B.; KWON, M. Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. **The Journal of Microbiology**, v.45, n.2, 2007. p.179-184
- LEOTTA, G.A.; VIGO, G.B.; CHINEN, I.; PRIETO, M.; CALLEJO, R.; RIVAS, M. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.38, 2006. p.125-129
- LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AUSTIN, F.W. Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, 2004. p.263-267

LUO, Y.; ZENG, Q.; GLISSON, J.R. ; JACKWOOD, M.W.; CHENG, I.N.; WANG, C. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chicken against homologous strain challenge. **Vaccine**, v.17, 1999. p.821-831

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.L.; CLARK, D.P. Princípios de Genética Bacteriana. In: _____ (Ed.). **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.278-309

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, 2002, p.47-51

MATOS, P.A.C; FERNANDES-FONTAINHAS, A. Antioxidant defences in animals. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.12, n.1, 2005, p.101-103

MAY, B.J.; ZHANG, Q.; LI, L.L.; PAUSTIAN, M.L.; WHITTAM, T.S.; KAPUR, V. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.6, 2001, p.3460-3465

McCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, n.108, 2000. p.652-659

MELNIKOW, E.; SCHOENFELD, C.; SPEHR, V.; WARRASS, R.; GUNKEL, N.; DUSZENKO, M.; SELZER, P.M.; ULLRICH, H.J. A compendium of antibiotic-induced transcription profiles reveals broad regulation of *Pasteurella multocida* virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v.131, 2008. p.277-29

MITCHISON, M.; WEI, L.; KWANG, J.; WILKIE, I.; ADLER, B. Overexpression and immunogenicity of the Oma87 outer membrane protein of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v.72, 2000. p.91-96

MIZAN, S.; HENK, A.; STALLINGS, A., MAIER, M.; LEE, M.D. Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialic lactose specificity from *Pasteurella multocida*. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.24, 2000. p.6874-6883

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

MUHAIRWA, A.P.; MTAMBO, M.M.A.; CHRISTENSEN, J.P.; BISGAARD, M. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. **Veterinary Microbiology**, v.78, 2001. p.139-153

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

NAGAI, S.; SOMENO, S.; YAGIHASHI, T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.4, 1994. p.1004-1010

NASCIMENTO, V.P.; GAMA, N.M.S.Q.; CANAL, C.W. Coriza infecciosa das galinhas, pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas: FACTA, 2009. p.503-530

OGUNNARIWO, J.A.; SCHRYVERS, A.B. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.3, 2001. p.890-896

O. HENEGARIU, N.A.; HEEREMA, S.R.; DLOUHY, G.H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v.23, n.3, 1997. p.504-5111

PAUSTIAN, M.L.; MAY, B.J.; KAPUR, V. *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. **Infection and Immunity**, v.69, n.6, 2001. p.4109-4115

PAUSTIAN, M.L.; MAY, B.J.; CAO, D.; BOLEY, D.; KAPUR, V. Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.23, 2002. p.6714-6720

PEDERSEN, K.; DIETZ, H.H.; JORGENSEN, J.C.; CHRISTENSEN, T.K.; BREGNBALLE, T.; ANDERSEN, T.H. *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. **Journal of Wildlife Disease**, v.39, n.4, 2003. p.808-816

PER, H.; KUMANDAS, S.; GÜMÜS, H.; ÖZTÜRK, M.K.; ÇOSKUN, A. Meningitis and subgaleal, subdural, epidural empyema due to *Pasteurella multocida*. **Clinical Communications: Pediatrics**, v.39, v.1, 2010. p.35-38

PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIN, S.; DOMINGUEZ, W.; APPLGATE, B. Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.15, n.2, 2007. p.176-198

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

POTTER, A.A.; SCHRYVERS, A.B.; OGUNNARIWO, J.A.; HUTCHINS, W.A.; LO, R.; WATTS, T. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. **Microbial Pathogenesis**, v.27, 1999. p.197-206

PRUIMBOOM, I.M.; RIMLER, R.B.; ACKERMANN, M.R.; BROGDEN, K.A. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. **AvianDisease**, v.40, 1996. p.887-893

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

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A.; VARADARJ, M.C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v.16, n.4, 2002. p.307-314

RHOADES, K.R.; RIMLER, R.B. Fowl cholera. In: ADLAM, C.; RUTTER, J.M. (Ed.). **Pasteurella and Pasteurellosis**. 1.ed. London: Academic Press Limited, 1989. p.95-144

RHOADES, K.R.; RIMLER, R.B. Virulence and toxigenicity of capsular serogroup D *Pasteurella multocida* strains isolated from avian hosts. **Avian Disease**, v.34, n.2, 1990. p. 384-388

RUFFOLO, C.G.; ADLER, B. Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. **Infection and immunity**, v.64, n.8, 1996. p.3161-3167

RYU, H.; KIM, C.J. Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. **Journal of Veterinary Science**, v.1, n.2, 2000. p.87-95

SCHOSKE, R.; VALLONE, P.M.; RUITBERG, C.M.; BUTLER, J.M. Multiplex-PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10Y short tandem repeat (STR) loci. **Anal Bioanal Chemistry**, v.375, 2003. p.333-343

SELLYEI, B.; VARGA, Z.; IVANICS, E.; MAGYAR, T. Characterisation and comparison of avian *Pasteurella multocida* strains by conventional and ERIC-PCR assays. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.56, n.4, 2008. p.429-440

SELLYEI, B.; BÁNYAI, K.; MAGYAR, T. Characterisation of the *ptfA* gene of avian *Pasteurella multocida* strains by allele-specific polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, 2010. p.607-610

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

SHAYEGH, J.; SHARAF, J.D.; MIKAILI, P.; NAMVAR, H. Pheno-and genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from goat in Iran. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, 2009. p.3707-3710

SHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A.A.; GAUTAM, R.; SINGH, V.P.; CHAUDHURI, P.; SRIVASTAVA, S.K. PCR assay for rapid detection of *Pasteurella multocida* serogroup A in morbid tissue materials from chickens with fowl cholera. **The Veterinary Journal**, v.168, 2004. p.349-352

SHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A.A.; GAUTAM, R.; SINGH, V.P.; SAXENA, M.K.; SRIVASTAVA, S.K. Identification of avian strains of *Pasteurella multocida* in India by conventional and PCR assays. *The Veterinary Journal*, v.172, 2006. p.561-564

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

SIJU, J.; KUMAR, A.A.; SCHIAVACHANDRA, S.B.; CHAUDHURI, P.; SRIVASTAVA, S.K.; SINGH, V.P. Cloning and characterization of type 4 fimbrial gene (*ptfA*) of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 (strains P₅₂). **Veterinary Research Communications**, v.31, 2007. p.397-404

SNIPES, K.P.; HIRSH, D.C.; KASTEN, R.W.; CARPENTER, T.E.; HIRD, D.W.; McCAPES, R.H. Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-89. **Avian Disease**, v.34, 1990. p.315-320

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

STEEN, J.A.; STEEN, J.A.; HARRISON, P.; SEEMANN, T.; WILKIE, I.; HARPER, M.; ADLER, B.; BOYCE, J.D. Fis is essential for capsule production in *Pasteurella multocida* and regulates expression of other important virulence factors. **PLOS Pathogens**, v.6, n.2, 2010. p.1-14

STEENBERGEN, S.M.; LICHTENSTEIGER, C.A.; CAUGHLAN, R.; GARFINKLE, J.; FULLER, T.E.; VIMR, E.R. Sialic acid metabolism and systemic Pasteurellosis. **Infection and Immunity**, v.73, n.3, 2005. p.1284-1294

SUBAAHARAN, S.; BLACKALL, L.L.; BLACKALL, P.J. Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v.141, 2010. p.354-361

TABATAI, L.B. Identification of *Pasteurella multocida* CHAPS-soluble outer membrane proteins. **Avian Disease**, v.52, 2008. p.147-149

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**, v.47, n.4, 2009. p.951-958

TATUM, F.M.; YERSIN, A.G.; BRIGGS, R.E. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* *phaB2* mutant in turkeys. **Microbial Pathogenesis**, v.39, 2005. p.9-17

TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J.; LEE, C.W.; PAPADIMITRIOU, J.M.; DAWKINS, H.J.S. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.4, 1998. 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**, v.39, n.3, 2001. p.924-929

UBABEF- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual – 2009**. São Paulo: UBABEF, 2010.

UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual – 2010**. São Paulo. UBABEF, 2011

VALENTINE, J.S.; DOUCETTE, P.A.; ZITTIN POTTER, S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v.74, 2005. p.563-593

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

VIMR, E.; LICJTENSTEIGER, C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question **Trends in Microbiology**, v.10, 2002. p.254-257

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

WATT, J.M.; SWIATLO, E.D.; WADE, M.M.; CHAMPLIN, F.R. Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. **FEMS Microbiology Letters**, v.225, 2003. p.9-14

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

WILKS, K. E.; DUNN, K. L. R.; FARRANT, J. L.; REDDIN, K. M.; GORRINGE, A. R.; LANGFORD, P. R.; KROLL, J. S. Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. **Infection and Immunity**, v.66, n.1, 1998, p.213-217

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

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 dermonecrotxin production. **Veterinární Medicína**, v.8, 2005. p.345-354

ZANATTA, D. **Associação Gaúcha de Avicultura e Sindicato das Indústrias de Produção Avícolas no RS**. 2008. Disponível em: www.cpact.embrapa.br/eventos/2008. Acesso em: maio, 2011.

ZYWIETZ, A.; GOHLA, A. SHCMELZ, M.; SCHULTZ, G. Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by G_q-dependent and -independent mechanisms –

involvement of G_q but not G_{11} . **The Journal of Biological Chemistry**, v.276. n.6, 2001.
p.3840-3845

APÊNDICE A – Amostras de *Pasteurella multocida*: origem de isolamento, tipo capsular, hemólise, crescimento em ágar MacConkey, prova da oxidase e prova da catalase.

Amostra	Origem	Sorotipagem ¹ convencional	Sorotipagem ² molecular	Hemólise	Crescimento em MacConkey	Oxidase	Catalase
1	Galinha	A	A	-	-	+	+
2	Galinha	A	A	-	-	+	+
3	Galinha	A	A	-	-	+	+
4	Galinha	A	A	-	-	+	+
5	Galinha	A	A	-	-	+	+
6	Galinha	A	A	-	-	+	+
7	Galinha	A	A	-	-	+	+
8	Galinha	A	A	-	-	+	+
9	Galinha	A	A	-	-	+	+
10	Galinha	A	A	-	-	+	+
11	Galinha	A	A	-	-	+	+
12	Galinha	ND	A	-	-	+	+
13	Galinha	ND	A	-	-	+	+
14	Galinha	ND	A	-	-	+	+
15	Galinha	A	A	-	-	+	+
16	Galinha	A	A	-	-	+	+
17	Galinha	ND	A	-	-	+	+
18	Galinha	ND	A	-	-	+	+
19	Galinha	ND	A	-	-	+	+
20	Galinha	A	A	-	-	+	+
21	Peru	A	A	-	-	+	+
22	Galinha	A	A	-	-	+	+
23	Galinha	ND	A	-	-	+	+
24	Galinha	ND	ND	-	-	+	+
25	Suíno	A	A	-	-	+	+
26	Suíno	A	A	-	-	+	+
27	Galinha	ND	A	+	-	+	+
28	Suíno	A	A	-	-	+	+
29	Suíno	A	A	-	-	+	+
30	Suíno	A	A	+	-	+	+
31	Suíno	A	A	-	-	+	+

Legenda:

1: Teste de hialuronidase e teste da acriflavina

2: Multiplex-PCR 01

+: amostra positiva

-: amostra negativa

ND: não determinada

APÊNDICE B - Genes de virulência pesquisados: sigla, processo ou enzima do qual faz parte e função.

Sigla	Processo ou enzima	Função
<i>ompH</i>	proteína da membrana externa (porina)	- Transporte de substâncias - Fator imunogênico
<i>oma87</i>	proteína da membrana externa (porina)	- Transporte de substâncias - Fator imunogênico
<i>sodA</i>	dismutase	- Enzima MnSOD: evita peroxidação
<i>sodC</i>	dismutase	- Enzima CuSOD: evita peroxidação
<i>hgbA</i>	aquisição de ferro	- Proteína HgbA: liga-se à hemoglobina na captação de ferro
<i>hgbB</i>	aquisição de ferro	- Proteína HgbB: liga-se à hemoglobina na captação de ferro
<i>exBD-tonB</i>	energia para metabolização do ferro	- Complexo Protéico TonB: supre a energia do metabolismo do ferro
<i>nanB</i>	sialidase	- Proteína NanH: envolvida na captação de carbono
<i>nanH</i>	sialidase	- Proteína NanB: envolvida na captação de carbono
<i>ptfA</i>	Fímbria (fímbria tipo IV)	- Auxilia na colonização do trato respiratório
<i>pfnA</i>	hemaglutinina	- Auxilia na colonização do trato respiratório
<i>toxA</i>	toxina dermonecrótica	- Estimula a proliferação de osteoclastos e inibe a diferenciação de osteoblastos - Estimula a mitose em geral
<i>hyaD-hyaC</i>	cápsula	- Proteína da região de biossíntese da cápsula tipo A
<i>bcbD</i>	cápsula	- Proteína da região de biossíntese da cápsula tipo B
<i>dcbF</i>	cápsula	- Proteína da região de biossíntese da cápsula tipo D

APÊNDICE C – *Primers*: denominação, gene de referência e número de acesso ao GenBank.

Gene	Nome do <i>primer</i>	Número de acesso no GenBank
<i>kmt</i>	KMT	AF016259
<i>ompH</i>	OmpH	U50907
<i>oma87</i>	Oma87	U60439
<i>sodA</i>	SodA	AE006034
<i>sodC</i>	SodC	X83124
<i>hgbA</i>	HgbA	Pm0337
<i>hgbB</i>	HgbB	Pm0337
<i>exBD-tonB</i>	ExbB-TonB	AE006158
<i>nanB</i>	NanB	AF274868
<i>nanH</i>	NanH	AF274869
<i>ptfA</i>	Fim4	AE006044
<i>pfhA</i>	PfhA	AY035342
<i>toxA</i>	ToxA	AF240778
<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA	AF067175
<i>bcbD</i>	CAPB	AF169324
<i>dcbF</i>	CAPD	AF302465

APÊNDICE D – Protocolos de PCR: composição e concentração dos reagentes do *mix*, número de ciclos da amplificação, condições do termociclador e concentração do gel de agarose utilizada para cada reação.

Gene	Composição do <i>mix</i> de reagentes	Número de ciclos	Condições do termociclador			Concentração gel de agarose (%)
			Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>kmt</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (2,5mM), 2µL cada primer (40pmol), 1,5U TaqPolimerase, 0,75µL MgCl ₂ (1,5mM), 2µL DNA	30	95°C – 60seg	55°C – 60seg	72°C – 60seg	1,2
<i>ompH</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	57°C – 30seg	72°C – 60seg	1,2
<i>oma87</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 60seg	1
<i>sodA</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 40seg	1,2
<i>sodC</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 30seg	1,2
<i>hgbA</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	53°C – 30seg	72°C – 60seg	1,2
<i>hgbB</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	54°C – 30seg	72°C – 45seg	1,2
<i>exBD-tonB</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 90seg	1

(continuação)

Gene	Composição do mix de reagentes	Número de ciclos	Condições do termociclador			Concentração gel de agarose (%)
			Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>nanB</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	56°C – 30seg	72°C – 45seg	1,2
<i>nanH</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	56°C – 30seg	72°C – 30seg	1,2
<i>ptfA</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 60seg	1,2
<i>pfhA</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	56°C – 30seg	72°C – 60seg	1,2
<i>toxA</i>	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 1U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 2µL DNA	25	94°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 80seg	1
<i>hyaD-hyaC</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (200µM), 2µL cada primer (3,2pmol), 1U TaqPolimerase, 1µL MgCl ₂ (2mM), 2µL DNA	30	95°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 60seg	1
<i>bcbD</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (200µM), 2µL cada primer (3,2pmol), 1U TaqPolimerase, 1µL MgCl ₂ (2mM), 2µL DNA	30	95°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 30seg	1
<i>dcfF</i>	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTP (200µM), 2µL cada primer (3,2pmol), 1U TaqPolimerase, 1µL MgCl ₂ (2mM), 2µL DNA	30	95°C – 30seg	55°C – 30seg	72°C – 30seg	1

APÊNDICE E – Multiplex-PCR: Composição e concentração dos reagentes do *mix*.

Multiplex-PCR	Composição do <i>mix</i> de reagentes
Multiplex-PCR 1	2,5µL Tampão 10x, 1,25µL dNTP (2,5mM), 2µL cada primer (20pmol), 2U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 5µL DNA
Multiplex-PCR 2	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 2U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 5µL DNA
Multiplex-PCR 3	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 2U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 5µL DNA
Multiplex-PCR 4	2,5µL Tampão 10x, 0,4µL dNTP (10mM), 0,5µL cada primer (10pmol), 2U TaqPolimerase, 1,25µL MgCl ₂ (2,5mM), 5µL DNA

APÊNDICE F – Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 06 amostras de origem suína de *Pasteurella multocida* analisadas.

Gene	Amostras Positivas		Amostras Negativas	
	Total (n=06)	Total (%)	Total (n=06)	Total (%)
<i>ompH</i>	06	100	0	0
<i>oma87</i>	06	100	0	0
<i>sodA</i>	06	100	0	0
<i>sodC</i>	06	100	0	0
<i>hgbA</i>	06	100	0	0
<i>hgbB</i>	02	33	04	67
<i>exBD-tonB</i>	06	100	0	0
<i>nanB</i>	06	100	0	0
<i>nanH</i>	06	100	0	0
<i>ptfA</i>	06	100	0	0
<i>pfhA</i>	04	67	02	33
<i>toxA</i>	0	0	06	100
<i>hyaD-hyaC</i>	06	100	0	0
<i>bcbD</i>	0	0	06	100
<i>dcbF</i>	0	0	06	100