

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

**Avaliação da resistência antimicrobiana e pesquisa de genes de virulência em
amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de aves**

Autor: Éverton Eilert Rodrigues

PORTO ALEGRE

2011/2

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

**Avaliação da resistência antimicrobiana e pesquisa de genes de virulência em
amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de aves**

Autor: Éverton Eilert Rodrigues

**Trabalho apresentado como
requisito parcial para graduação
em Medicina Veterinária**

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

Co-orientador: Thales Quedi Furian

PORTO ALEGRE

2011/2

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo exemplo de vida.
Ao meu irmão, pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A todos os animais, pela imensa contribuição que dão à natureza e aos humanos, seja sob a forma social, nutricional ou educacional.

Aos meus pais, Carmen e Vicente, por todo o amor dispensado a mim, pelos cuidados, carinhos, educação, apoio e exemplos de dignidade e caráter transmitidos ao longo desses meus 29 anos.

Ao meu irmão, Anderson, pela amizade e respeito. Vivo de saudades de ti.

A minha avó Santa, pela simplicidade e incentivo ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, pelos ensinamentos e acima de tudo, confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, pela amizade, inteligência e aprendizados nas conversas na sala do cafezinho.

Ao Thales, pela amizade e paciência nas explicações na rotina laboratorial ao longo dos meus 4 anos de CDPA e pela grande ajuda na co-orientação da minha monografia.

Aos colegas e funcionários do CDPA/UFRGS pela camaradagem e companheirismo durante meu tempo de estágio. Todos contribuíram de alguma forma na minha formação.

Ao prof. Dr. Cláudio W. Canal, pela oportunidade de fazer estágio em seu laboratório logo que cheguei à FAVET/UFRGS.

Aos profs. Dr. Daniel Passos e Dra. Tania Weimer, que me apresentaram a Iniciação Científica ainda nos tempos de ULBRA e me passaram os primeiros valores éticos na pesquisa.

Aos professores de Medicina Veterinária da ULBRA que iniciaram minha formação acadêmica.

A minha namorada Tatiana, pelo amor e carinho.

Aos colegas da ATMV 2011/2 por proporcionarem momentos descontraídos e divertidos ao longo da nossa empreitada, especialmente à Xuki, Gabriel Lima, Fernando, Gabriel Frainer, Laura Argenti e Paola.

Ao Rossi, meu maior amigo da espécie canina. Foi muito bom estar contigo!

A UFRGS, CNPq e FAPERGS pelo auxílio financeiro durante o tempo de bolsista.

A Deus, por me dar condições de saúde e disposição para conclusão do curso.

E a todas as pessoas que serviram de inspiração ou que me ajudaram de alguma forma ao longo desse período, especialmente, Luana e Letícia.

RESUMO

A necessidade de otimizar o uso dos recursos disponíveis, além de manter a competitividade no setor avícola justificam o emprego do sistema atual de criação baseado em altas densidades populacionais. Contudo, a elevada concentração de aves por unidade de área torna os lotes mais suscetíveis a infecções por organismos patogênicos e à propagação destes, através de diferentes unidades de produção. Estas características de criação associadas a condições sanitárias precárias são fatores primordiais para que doenças como a cólera aviária (CA) causada pela bactéria *Pasteurella multocida* se instale. Geralmente, a CA apresenta-se de forma aguda e com altos índices de morbidade e de mortalidade. Os fatores de virulência da *P. multocida* envolvidos na patogenia de CA ainda não estão totalmente esclarecidos. O tratamento se dá através do uso de antimicrobianos com variação de sucesso na terapêutica. O objetivo do trabalho foi determinar o perfil de sensibilidade e de resistência antimicrobiana *in vitro* frente a 12 antimicrobianos e detectar dois genes candidatos à virulência (*Pm0762* e *Pm1231*) através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 25 amostras de *P. multocida* isoladas de aves. Os resultados do antibiograma revelam que as amostras de *P. multocida* foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados, embora tenha sido observado certo grau de resistência antimicrobiana. A maior resistência encontrada foi com a tetraciclina (8%), seguida da neomicina (4%). Os antimicrobianos amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, doxiciclina, florfenicol, gentamicina e a combinação de sulfametoxazol + trimetoprim apresentaram 100% de sensibilidade a todas as amostras. Os resultados sugerem que alguns cuidados devem ser tomados no uso da terapia antimicrobiana. Através da técnica de PCR foi possível fazer a amplificação específica dos fragmentos dos genes *Pm0762* e *Pm1231* de todas as amostras. A detecção dos genes que regulam a transcrição (*Pm0762* e *Pm1231*) merece um estudo mais aprofundado envolvendo os mecanismos de regulação molecular associados à virulência da *P. multocida*. A associação das duas ferramentas empregadas neste trabalho (antibiograma e PCR) poderão contribuir para um controle mais eficaz da CA e oferecer estratégias de prevenção contra a *P. multocida*.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, PCR, antibiograma, cólera aviária

ABSTRACT

The need to optimize use of available resources while maintaining the competitiveness of the poultry sector justify the use of the current system based on creating high population densities. However, the high concentration of birds per unit area makes lots more susceptible to infections by pathogens and the spread of these through different production units. These features associated with creating unsanitary conditions are primary factors for diseases such as fowl cholera (FC) caused by the bacterium *Pasteurella multocida* to install. Generally, the FC presents acutely and with high rates of morbidity and mortality. The virulence factors of *P. multocida* involved in the pathogenesis of FC are not yet fully understood. The treatment is through the use of antimicrobial agents with varying success in therapy. The objective of this study was to determine the sensitivity and antimicrobial resistance in vitro against 12 antimicrobial agents and detect two candidate genes for virulence (*Pm0762* and *Pm1231*) by Polymerase Chain Reaction (PCR) in 25 samples of *P. multocida* isolated from avian. The results of susceptibility testing revealed that samples of *P. multocida* isolated from birds were susceptible to most antimicrobials tested, although it was observed some degree of antimicrobial resistance. The greatest resistance was found with tetracycline (8%), followed by neomycin (4%). The antibiotics amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, doxycycline, florfenicol, gentamicin and the combination of sulfamethoxazole and trimethoprim showed 100% sensitivity for all samples. The results suggest that some care must be taken in the use of antimicrobial therapy. By PCR it was possible to specific amplification of gene fragments *Pm0762* and *Pm1231* of all samples. The detection of genes that regulate transcription (*Pm0762* and *Pm1231*) deserves further study involving the molecular regulation mechanisms associated with the virulence of *P. multocida*. The combination of two tools used in this study (antibiogram and PCR) may contribute to more effective control of the FC and offer prevention strategies against *P. multocida*.

Keywords: *Pasteurella multocida*, PCR, antibiogram, fowl cholera

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Padrões interpretativos dos diâmetros dos halos de inibição dos agentes antimicrobianos testados.....	21
Tabela 2 -	Protocolo de PCR: Composição e concentração dos reagentes do mix.....	21
Tabela 3 -	Genes de virulência pesquisados, sequência dos <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos da PCR das amostras de <i>P. multocida</i>	22
Tabela 4 -	Padrão de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 25 amostras de <i>P. multocida</i> isoladas de aves frente a 12 antimicrobianos.....	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Placa de *Müller Hinton* com formação dos halos de inibição após 20 horas de incubação a 35° C ± 2°C frente à amostra de *P. multocida*..... 20
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio com os produtos de amplificação do gene *Pm0762* (567pb). Legenda: PM: marcador de peso molecular (100pb); 01 a 06: amostras de *P. multocida*, 07: *P. multocida* ATCC 15742; 08: *P. multocida* ATCC 12945; 09: *P. multocida* ATCC 12946; 10: controle negativo. A seta indica fragmento de 600pb..... 24
- Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio com os produtos de amplificação compatíveis com o gene *Pm1231* (601pb). Legenda: PM: marcador de peso molecular (100pb); 01 a 31: amostras de *P. multocida*, 32: *P. multocida* ATCC 15742; 33: *P. multocida* ATCC 12945; 34: *P. multocida* ATCC 12946; 35: *P. multocida* ATCC 12946 (duplicata); 36: controle negativo. A seta indica fragmento de 600pb..... 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro (s)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
BHA	<i>Brain-Heart Agar</i> (Ágar Cérebro-Coração)
CA	Cólera Aviária
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
cm	Centímetro (s)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
L	Litro (s)
m	Metro (s)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MH	<i>Müller Hinton</i>
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OIE	<i>Office International des Epizooties</i> (Organização Mundial de Saúde Animal)
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Marcador de peso molecular
pmol	Picomol
RS	Rio Grande do Sul
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	<i>Pasteurella multocida</i>	12
2.2	Cólera Aviária	14
2.3	Resistência antimicrobiana	16
2.4	Fatores associados à virulência	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Amostras de <i>Pasteurella multocida</i>	19
3.2	Extração do DNA bacteriano	19
3.3	Resistência antimicrobiana	19
3.4	PCR e Eletroforese	21
4	RESULTADOS	23
4.1	Resistência e suscetibilidade antimicrobiana	23
4.2	Genes de virulência	23
5	DISCUSSÃO	25
6	CONCLUSÕES	29
	REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial da avicultura por ser o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango. Na produção de carne de frango, o setor atingiu recorde de produção de frangos em 2010, aproximando o país do segundo posto mundial. Em exportações, registrou-se novo recorde histórico em volume, com total de 3,8 milhões de toneladas de frangos, exportadas para mais de 150 países. A produção de carne de frango chegou a 12,2 milhões de toneladas em 2010, correspondendo a um crescimento de 11,38% em relação a 2009. O crescimento em 2010 foi impulsionado, principalmente pelo aumento de consumo de carne de frango e pela expansão de 5,1% nas exportações. Para elucidar essa expansão das exportações, a participação do frango brasileiro nas importações chinesas aumentou em mais de 1000% de 2009 para 2010. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno, e 31% para exportações. (PRODUÇÃO ANIMAL-AVICULTURA, 2011; UBABEF, 2011).

A região sul do Brasil é responsável por mais de 70% da exportação de frangos do país. O estado de Santa Catarina é o maior exportador (26,71%), seguido do Paraná (26,19%) e do Rio Grande do Sul (20,95%). No ano de 2010, os maiores importadores da carne de frango brasileira foram o Oriente médio (1,365 milhão de toneladas), Ásia (1,008 milhão de toneladas) e África (495,3 mil toneladas) (UBABEF, 2011). A avicultura é um setor da economia brasileira que tem grande importância sócio-econômica por gerar cerca de 4,5 milhões de empregos (diretos e indiretos). Somente no Rio Grande do Sul, gera 45 mil empregos diretos e 860 mil atividades indiretas, assim fortalecendo a economia dos municípios e atuando como fator de fixação da mão de obra familiar no meio rural (TURRA, 2010).

O país tem sido competente em manter o *status* sanitário dos plantéis avícolas de acordo com os padrões internacionais. As principais barreiras não-tarifárias que regem as exportações de carne de frango são, de modo geral, de ordens técnicas, sanitárias e agrícolas (fitossanitárias) (ALVES, 2008).

Neste cenário, destacam-se as doenças de origem bacteriana, as quais têm desencadeado grandes perdas econômicas à indústria avícola devido aos atuais sistemas de criação, baseados na alta densidade populacional que aumentam os riscos de disseminação de doenças, especialmente se forem negligenciadas as medidas de biossegurança. Entre as

doenças que podem trazer prejuízos à avicultura brasileira, encontra-se a cólera aviária (CA) causada pela bactéria *Pasteurella multocida*.

O termo pasteurelose resume um grupo de enfermidades infecciosas causadas por microrganismos pertencentes ao gênero *Pasteurella*. Atualmente, dez gêneros compõem a família *Pasteurellaceae* e algumas espécies responsáveis por causarem doenças nas aves são: *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Avibacterium gallinarum*, *A. paragallinarum* e *Gallibacterium anatis*.

A *P. multocida* é uma bactéria Gram negativa e tem sido identificada como agente causador de diversas doenças de importância econômica nos animais. Este microrganismo parasita o epitélio da cavidade oral e do trato respiratório superior de animais sadios e ocasionalmente de humanos.

A cólera aviária ou pasteurelose é uma doença contagiosa que afeta aves domésticas, aquáticas e silvestres. Usualmente ocorre como uma fulminante doença septicêmica associada com alta morbidade e mortalidade gerando grandes perdas econômicas. O tratamento da CA com antimicrobianos tem contribuído para o controle de surtos. O sucesso do tratamento depende muito da rapidez e eficiência do diagnóstico e escolha correta da droga. Em função dos mecanismos conhecidos de resistência bacteriana, torna-se fundamental a realização de antibiograma para obter sucesso na terapêutica.

A *P. multocida* possui diversos mecanismos moleculares associados com a adaptação e sobrevivência, virulência e patogenicidade, resistência antimicrobiana, entre outros. Com relação aos fatores associados à virulência e patogenicidade, encontram-se os genes reguladores de transcrição que desempenham um papel importante na adaptação, sobrevivência e virulência da bactéria.

O objetivo do trabalho foi determinar o perfil de sensibilidade e de resistência antimicrobiana *in vitro* frente a 12 antimicrobianos e detectar dois genes candidatos à virulência (*Pm0762* e *Pm1231*) através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 25 amostras de *P. multocida* isoladas de aves.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo pasteurelose resume um grupo de doenças infecciosas causadas por microrganismos pertencentes ao gênero *Pasteurella*. Atualmente, dez gêneros compõem a família Pasteurellaceae (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). A taxonomia desta família passou por recentes reclassificações de espécies em função do avanço de técnicas que revelam o grau de parentesco entre as bactérias (BLACKALL et al., 2005). Os microrganismos que fazem parte dessa família estão envolvidos em uma grande variedade de doenças com sintomatologia predominantemente respiratória em diversos hospedeiros (BISGAARD, 1993).

2.1 *Pasteurella multocida*

A *P. multocida* é o agente etiológico causador da cólera aviária (CA). É uma bactéria Gram negativa (0,25 a 0,4mm de largura por 0,6 a 2,5mm de comprimento), bacilo bipolar imóvel que cresce em ágar sangue sem provocar hemólise e não cresce em ágar MacConkey. Não forma esporo e pode ocorrer isoladamente, em pares e, ocasionalmente, em cadeias ou filamentos, sendo que geralmente esta tendência ao pleomorfismo surge depois de repetidos cultivos em ágar. A cápsula pode ser demonstrada em culturas isoladas recentemente através de métodos indiretos de coloração. O crescimento da bactéria se dá tanto em aerobiose quanto em anaerobiose com temperatura de crescimento ótima à 37°C e com pH entre 7,2 a 7,8. O emprego de meios contendo extrato de carne, peptona e hidrolisado de caseína estimula o crescimento da bactéria. O soro ou sangue de alguns animais inibem o crescimento da *P. multocida*. Esta inibição é maior com sangue de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos. O sangue de galinhas, patos, suínos e búfalos possuem pouco ou nenhum efeito inibidor (RYU, 1961). Ágar dextrose com 5% de soro de ave é um excelente meio para isolamento e crescimento da bactéria (GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008).

A morfologia macroscópica da colônia observada com o emprego de luz oblíqua é uma das características mais usadas no estudo da *P. multocida*. Em isolamentos primários de aves com CA aguda, as colônias podem aparecer iridescentes, de tamanho médio (2 a 3mm), circulares, opacas, geralmente lisas, convexas, translúcidas, brilhantes e patogênicas. Em casos crônicos de CA, as colônias são azuis, pequenas (1 a 2mm), circulares, lisas, convexas ou planas, translúcidas e de virulência relativamente baixa. O terceiro tipo é intermediário em suas propriedades de virulência e iridescência. As propriedades fenotípicas fisiológicas da

P. multocida são utilizadas para identificação e diferenciação das espécies. A *P. multocida* não produz gás, mas produz oxidase, catalase, peroxidase e apresenta odor característico (GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008).

As cepas de *P. multocida* são convencionalmente classificadas em 5 sorogrupos (A, B, D, E e F) baseados nos antígenos capsulares e estão relacionados com a patogenicidade. Os microrganismos pertencentes às cepas A e D normalmente infectam hospedeiros aviários, sendo que a subespécie *multocida* e o sorogrupo A são mais frequentemente isolados de casos da forma mais severa de CA. As amostras mais patogênicas são encapsuladas e a perda ou ausência da cápsula tem relação com bactérias de baixa patogenicidade. As cepas de *P. multocida* também são classificadas em 16 sorotipos de acordo com a presença dos antígenos somáticos (1 – 16), sendo que todos já foram encontrados em aves, dos quais o 1, 3, 4 e cruzamento entre 3 e 4 são os mais comuns (BACK, 2010; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

Segundo Hunt; Adler; Townsend (2000), o uso de técnicas baseadas na apresentação dos antígenos capsulares e somáticos e dos perfis de fermentação bioquímica fornece informações insuficientes para estudos epidemiológicos. Alguns autores estão estabelecendo e propondo novas caracterizações das cepas de *P. multocida* através de técnicas moleculares baseadas em regiões específicas do genoma bacteriano (BLACKALL; MIFLIN, 2000; SHIVACHANDRA et al., 2006; SHIVACHANDRA; KUMAR; CHAUDHURI, 2008; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2010).

A patogenicidade ou a virulência da *P. multocida* é complexa e bastante variável. A intensidade dos sinais clínicos e a gravidade da doença variam de acordo com o hospedeiro, bem como as variações do sistema imune e as condições de contato entre a cepa e o hospedeiro (GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008).

A *P. multocida* também atua como um patógeno oportunista para os seres humanos e em geral está associada a mordidas ou arranhaduras de cães e gatos resultando em graves infecções localizadas ou sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (BISGAARD, 1993; FREDERIKSEN, 1993). Apesar da *P. multocida* ter condições de causar doença no homem, não há evidências de que amostras isoladas de aves sejam patogênicas para os humanos ou que constituam algum risco para a saúde pública (BACK, 2010; GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). A CA não tem nenhuma relação com a cólera humana, pois tratam-se de agentes etiológicos diferentes. Além da CA, as principais doenças de importância econômica causadas pela *P.*

multocida são: rinite atrófica em suínos, broncopneumonia enzoótica em bovinos e ovinos, septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos e coriza em coelhos (DZIVA et al., 2008).

2.2 Cólera Aviária

A cólera aviária (CA) é uma doença infecciosa aguda de origem bacteriana que acomete aves domésticas, aquáticas e silvestres. De ocorrência mundial e amplamente distribuída na natureza, esporadicamente provoca graves perdas econômicas em função da alta mortalidade e, em outras ocasiões, não é tão significativa devido à variabilidade da virulência das cepas e do *status* imunitário das aves. No Brasil, em função da maximização do uso das instalações com menor intervalo de vazio sanitário entre os lotes e aumento da densidade de aves, a incidência de CA está sendo descrita principalmente em explorações industriais de perus e em galinhas matrizes pesadas. Também tem sido descrita em criações de aves semi-extensivas e caipiras em alguns países (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

A doença é classificada de duas formas: aguda e crônica. Na forma clássica aguda, de caráter septicêmico, a observação da morte pode ser a única indicação da doença e as aves são encontradas com boa condição corporal. No estágio terminal da CA, a morte é causada por uma bacteremia massiva com hiperemia passiva generalizada, sendo um indicativo de choque atribuído à ação de endotoxinas. Em uma forma menos severa da doença, é possível observar depressão, perda de apetite, descarga mucóide nasal, cianose na crista e barbelas e diarreia (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000). A forma crônica é menos frequente e quando ocorre, são em aves sobreviventes da forma aguda ou infectadas com cepa de baixa patogenicidade. Os sinais variam de acordo com o local de infecção e são normalmente limitados a infecções localizadas envolvendo articulações, cavidade peritoneal, oviduto e inflamação das barbelas. Em poedeiras, pode haver queda na produção de ovos (BACK, 2010; GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009). Entretanto, cabe ressaltar que nenhum destes sinais clínicos são patognômicos da doença (MORAES, H.L.S., comunicação pessoal).

A presença e a intensidade das lesões variam de acordo com a severidade do surto. Em caso de septicemia aguda as lesões podem estar ausentes, mas de modo geral observa-se hiperemia, congestão generalizada e petéquias ou hemorragias nas mucosas e serosas do coração, gordura abdominal, moela, intestino e pulmão. O fígado pode estar com aumento de volume, congesto e com focos de necrose puntiformes. No caso de infecção aguda em perus, é comum observar pneumonia com acúmulo de exsudato fibrino-caseoso no pulmão. Em

poedeiras e matrizes de corte pode ocorrer postura abdominal, ooforite, atresia folicular ovariana e peritonite. Nos casos crônicos, lesões inflamatórias podem estar localizadas ou relacionadas com artrite, peritonite, salpingite, edema facial, acúmulo de exsudato caseoso no ouvido médio, no saco conjuntival e na barbela. Em perus é comum encontrar fibrose pulmonar (BACK, 2010).

A porta de infecção preferencial da *P. multocida* é o trato respiratório superior das aves, no entanto, a inoculação experimental via ocular, nasal e oral também gera lesões típicas e uma bacteremia progressiva, indicando que outras membranas mucosas também podem servir como portas de entrada (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000). Provavelmente, a *P. multocida* tenha maior importância atuando como agente secundário em enfermidades causadoras de imunossupressão e também associada aos agentes causadores primários de enfermidades respiratórias. A infecção é mais comum que a manifestação clínica da doença, e normalmente ocorre em consequência do manejo impróprio e doenças intercorrentes (NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

É possível que todas as espécies aviárias sejam suscetíveis à infecção pela *P. multocida*, sendo que as aves domésticas e os perus são as mais afetadas, provavelmente devido à exploração comercial. Os perus são mais suscetíveis à infecção do que as galinhas podendo a mortalidade chegar a atingir 90 a 100% do lote em 48 horas se a cepa for altamente virulenta. Nas galinhas, é mais comum observar a morte em poedeiras no início da fase de produção, pois estão mais suscetíveis do que aves com menos de 16 semanas de idade. Em galinhas naturalmente infectadas, a mortalidade pode chegar até 20% do plantel, com ocorrência de grandes perdas econômicas. É praticamente impossível afirmar com certeza como a bactéria é introduzida na granja, porém aves cronicamente infectadas e as sobreviventes de surtos de CA são consideradas a principal fonte de infecção para hospedeiros suscetíveis, seguidas de gatos e de ratos que são carreadores do agente sem manifestação clínica da doença (GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

A transmissão ocorre somente pela via horizontal de ave para ave através de excreções orais, nasais e conjuntivais de aves portadoras que disseminam a bactéria pelo ambiente. Outras fontes de infecção são carcaças de aves que morreram por CA, equipamentos, insetos e pessoas que tiveram contato com aves infectadas. Na avicultura comercial, a doença é disseminada rapidamente no momento em que é introduzida no lote, devido ao estreito contato entre as aves, contaminação da água e instalações. A transmissão vertical não representa um risco (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

O histórico da doença, sinais clínicos e as lesões macroscópicas fornecem informações úteis para o diagnóstico presuntivo, mas são insuficientes para o diagnóstico definitivo, que só será possível com o isolamento e identificação do agente. Para a detecção de infecções subclínicas e portadores, a inoculação de amostras suspeitas em ratos é recomendada, porém o uso de técnicas moleculares e tentativas de isolamento em meios seletivos são boas alternativas. A aplicação de boas práticas de manejo e rigorosas medidas de biossegurança são fundamentais para a prevenção de surtos de CA. A vacinação poderá ser utilizada em áreas onde a CA é prevalente, sendo que no Brasil, existe uma vacina inativada que protege somente contra os sorotipos 1 e 3. A vacinação não deve substituir as boas práticas sanitárias (BACK, 2010; GLISSON, HOFACRE, CHRISTENSEN, 2008; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

2.3 Resistência antimicrobiana

A avicultura industrial não pode prescindir do uso de antimicrobianos seja para fins terapêuticos e/ou profiláticos. Os antimicrobianos também são bastante utilizados como melhoradores de desempenho produtivo (agentes promotores de crescimento) através da dieta (água ou ração) em dosagens subterapêuticas. É fundamental conhecer as propriedades de cada antimicrobiano, suas indicações e a dosagem correta para se obter sucesso no tratamento do processo infeccioso. Os princípios gerais para o uso dos antimicrobianos envolvem o conhecimento da tríade: agente etiológico, antibiótico e o hospedeiro (ave). Como sabe-se que há variação na suscetibilidade de cada hospedeiro e que as cepas de locais diferentes podem apresentar variações na infectividade, é imprescindível a realização de testes *in vitro* para determinar a escolha do melhor fármaco para cada situação e região (SPINOSA et al., 2005; ROSTAGNO, 2011).

A terapia antimicrobiana é uma ferramenta eficaz contra a CA. Diversos antimicrobianos tem sido utilizados com bons resultados para o tratamento da CA. O sucesso dependerá da rapidez e da eficiência do diagnóstico e escolha correta do fármaco. Em função dos mecanismos conhecidos de resistência bacteriana, intrínseca ou adquirida, torna-se fundamental a realização de antibiograma para sucesso na terapêutica (WALSH, 2000). A literatura cita diversos fármacos para o controle da CA, e geralmente, as drogas de escolha são a base de sulfas, tetraciclina, eritromicina, estreptomicina e penicilina com bons resultados na maioria das vezes. Estas drogas podem ser administradas via água de bebida ou misturadas à ração (BACK, 2010; SPINOSA et al., 2005; NASCIMENTO; GAMA; CANAL, 2009).

Para que a terapêutica apresente maior eficácia, é necessário isolar o agente causador da doença e definir a sua sensibilidade *in vitro* frente aos antibióticos. No entanto, devido ao tempo necessário para a emissão de um resultado laboratorial e a necessidade de rapidez no tratamento, é comum iniciar a terapia antimicrobiana contra o suposto patógeno imediatamente após os primeiros sinais clínicos. A eficiência deste tratamento pré-diagnóstico, baseado somente na apresentação clínica da doença, é duvidosa; ainda que a escolha dos antibióticos seja baseada na experiência ou opinião de especialistas. O uso excessivo e indiscriminado desses agentes antimicrobianos exerce uma pressão seletiva sobre os genes que codificam a resistência aos antibióticos (WALSH, 2000; KEHRENBURG et al., 2001a; SELLYEI et al., 2009). Desta forma, torna-se fundamental a realização de testes periódicos de sensibilidade frente aos antibióticos empregados, pois permitem implementar medidas de controle eficazes e proporcionar a seleção adequada do antimicrobiano para o tratamento das aves (SELLYEI et al., 2009).

2.4 Fatores associados à virulência

A virulência da *P. multocida* com relação à CA é complexa e variável, depende da cepa, da espécie do hospedeiro, das variações entre os dois e das condições de contato entre eles. Em geral, a *P. multocida* é um habitante normal das vias aéreas superiores dos animais e pode subitamente demonstrar patogenicidade quando o equilíbrio entre hospedeiro e agente é quebrado. Para iniciar uma infecção, a *P. multocida* deve primeiro colonizar a parte superior do trato respiratório, aderir e invadir as células epiteliais. A capacidade da *P. multocida* invadir e se reproduzir no hospedeiro é aumentada pela presença da cápsula que envolve a bactéria. Nenhum fator de virulência tem sido associado, isoladamente, com a patogenicidade da amostra. Entretanto, a cápsula e os lipopolissacarídeos são considerados como os mais importantes fatores de virulência da *P. multocida*, embora outros fatores possam influenciar o resultado de infecções (SNIPES; GHAZIKHANIAN; HIRSH, 1987; TSUJI; MATSUMOTO, 1989, citados por CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000). Os demais fatores que estão mais associados à virulência são: endotoxinas, proteínas externas de membrana, sistemas de aquisição de ferro, proteínas de choque térmico, produção de neuraminidase e enzimas de clivagem de anticorpos (HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000; HUNT et al., 2001; EWERS et al., 2006; HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; STEEN et al., 2010).

Recentemente, Liu; Lawrence; Austin (2004), analisaram o genoma da *P. multocida* e compararam com outras sequências de DNA de outros microrganismos e identificaram dois

supostos genes de virulência (*Pm0762* e *Pm1231*) que modulam a regulação da transcrição e que estão presentes exclusivamente neste agente. Os genes reguladores da transcrição desempenham um papel importante na adaptação e na sobrevivência de bactérias. Os autores acreditam que os supostos genes reguladores da transcrição são espécie-específicos, e que métodos moleculares (PCR) visando a amplificação de fragmentos desses genes fornecem, de forma rápida e precisa, a diferenciação da *P. multocida* de outras bactérias. Além disso, *Pm0762* e *Pm1231* podem proporcionar sequências adicionais para fins de diagnóstico. A identificação e análise desses genes reguladores de transcrição em *P. multocida* podem ajudar a melhorar o entendimento sobre os mecanismos moleculares de adaptação, sobrevivência e virulência da *P. multocida*. Atualmente, estão sendo desenvolvidas pesquisas com diferentes microrganismos envolvendo os genes que regulam a transcrição para fornecer novos detalhes sobre os mecanismos moleculares de sobrevivência e de patogenicidade, e em última análise, contribuir para um controle mais eficaz e oferecer estratégias de prevenção contra estes microrganismos (TAMURA et al., 2004; LIU et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Porto Alegre/RS.

3.1 Amostras de *Pasteurella multocida*

Foram utilizadas 25 amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de duas empresas agropecuárias da região Sul do Brasil originárias de casos clínicos de CA.

Bringhenti (2011) caracterizou fenotipicamente as amostras através de isolamento microbiológico convencional e testes bioquímicos. As amostras foram confirmadas como *P. multocida* por PCR, através da amplificação de um fragmento do gene *kmt1* (específico de *P. multocida*) proposto por Townsend et al., (1998). Todas as amostras foram armazenadas em tubos *ependorf* com sangue total ovino e estocadas a $-78^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.2 Extração do DNA bacteriano

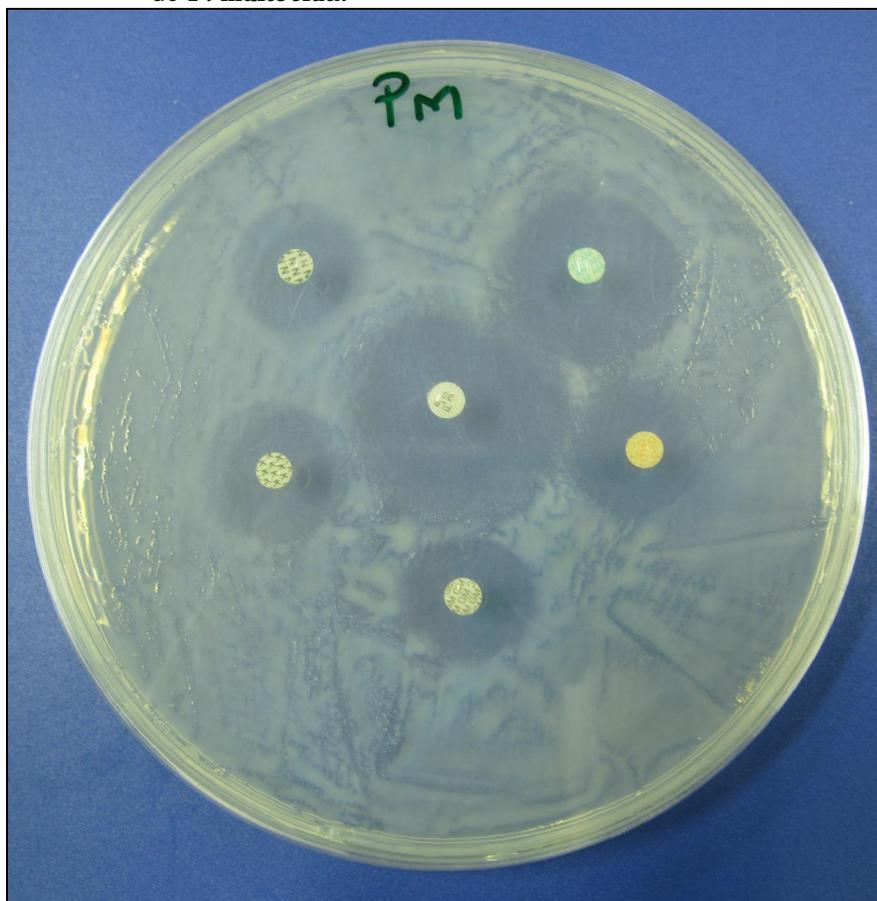
Foram selecionadas colônias puras do ágar sangue para a extração do DNA, que foi feita a partir do método de termo-extração, conforme técnica descrita por Ewers et al., (2006). O processo consiste em centrifugações das alíquotas da cultura bacteriana, lavagem da amostra e obtenção do DNA por lise das células bacterianas em banho-maria a $98^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por dez minutos. O sobrenadante do processo de aquecimento (DNA extraído) foi transferido para outro tubo, identificado e conservado a -20°C para posterior utilização no PCR.

3.3 Resistência antimicrobiana

Cada amostra foi testada frente a 12 agentes antimicrobianos (amoxicilina, ampicilina, canamicina, ceftiofur, doxiciclina, enrofloxacina, estreptomicina, florfenicol, gentamicina, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprim e tetraciclina) através do método de disco-difusão (BAUER et al., 1966). Para monitorar a precisão do método, duas cepas de referência, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram selecionadas como controles. As amostras encontravam-se estocadas em sangue total ovino a $-78^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após descongelamento, as amostras foram semeadas em placas contendo ágar BHA (*Brain-*

Heart Agar) e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 a 24 horas. Após este período, foram colhidas algumas colônias e preparadas em solução salina 0,85% até ajustar a turbidez de acordo com a escala padrão de *McFarland* 0,5. A partir da solução preparada, $150\mu\text{L}$ foram semeados sobre a superfície do ágar *Müller Hinton* (MH), estriadas com auxílio da alça de Drigalski e após cinco a sete minutos, os discos impregnados com antimicrobianos foram aplicados de maneira equidistantes sobre o meio de cultura. Para cada amostra, foram utilizadas duas placas de MH e seis antimicrobianos diferentes. A leitura dos halos (Figura 1) e interpretação dos resultados foi feita após 18 a 20 horas de incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Figura 1 - Placa de *Müller Hinton* com formação dos halos de inibição após 20 horas de incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ frente à amostra de *P. multocida*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Cada amostra foi classificada como sensível, intermediária ou resistente de acordo com os padrões estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Os critérios de classificação cada amostra estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Padrões interpretativos dos diâmetros dos halos de inibição dos agentes antimicrobianos testados.

Agente antimicrobiano	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	Resistente ()	Intermediário	Sensível ()
Amoxicilina	13,00	14 - 16	17,00
Ampicilina	13,00	14 - 16	17,00
Ceftiofur	17,00	18 - 20	21,00
Doxiciclina	12,00	13 - 15	16,00
Enrofloxacina	16,00	17 - 22	23,00
Florfenicol	14,00	15 - 18	19,00
Gentamicina	12,00	13 - 14	15,00
Canamicina	13,00	14 - 17	18,00
Neomicina	12,00	13 - 14	15,00
Estreptomicina	11,00	12 - 14	15,00
Tetraciclina	14,00	15 - 18	19,00
SXT ^a	10,00	11 - 15	16,00

^a Sulfametoxazol + Trimetoprim (19:1)

3.4 PCR e Eletroforese

O protocolo de PCR utilizado no experimento foi adaptado a partir do trabalho de Liu; Lawrence; Austin (2004), conforme consta na Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo de PCR: Composição e concentração dos reagentes do mix.

Reagentes	Volume (µL)
Água ultra pura	q.s.p. 25
Tampão ^a	2,5
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,75
dNTP (2 mM)	2
<i>Primer</i> Pm0762 F/R (25 pmol) ^b	2
<i>Primer</i> Pm1231 F/R (25 pmol) ^b	2
<i>Taq</i> Polimerase ^c	0,2 (<i>Pm0762</i>) / 0,1 (<i>Pm1231</i>)
DNA molde	2
Volume total	25

^a Tampão 1x para o gene *Pm0762* e Tampão 10x para o gene *Pm1231*.

^b Considerando que cada par de *primers* (*Pm0762*F/R ou *Pm1231*F/R) seja usado separadamente nas reações.

^c Concentração de 1U para o gene *Pm0762* e de 0,5U para o gene *Pm1231*.

Três cepas referência de *P. multocida* subsp. *multocida* (ATCC 15742, ATCC 12945, ATCC 12946) serviram de controle positivo da reação. Os genes pesquisados, os *primers* e o tamanho dos amplicons da PCR aguardados estão descritos na Tabela 3. As reações de PCR foram realizadas em termociclador nas seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de extensão final de 72°C por 2 minutos. As

análises dos produtos da PCR foram feitas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio seguidas de leitura em transiluminador ultravioleta.

Tabela 3 - Genes de virulência pesquisados, sequência dos *primers* e tamanho dos fragmentos da PCR das amostras de *P. multocida*.

Gene	Primer forward (5' – 3')	Primer reverse (5' – 3')	Tamanho (pb)
<i>Pm0762</i>	ttg tgc agt tcc gca aat aa	ttc acc tgc aac agc aag ac	567
<i>Pm1231</i>	aga aag cac atg acc aaa gg	gca gct act cgc aga agg tt	601

4 RESULTADOS

4.1 Resistência e suscetibilidade antimicrobiana

O perfil de resistência e suscetibilidade das amostras de *P. multocida* frente aos 12 antimicrobianos testados está representado na Tabela 4. A maior resistência encontrada foi com a tetraciclina (8%), seguida da neomicina (4%). Na zona intermediária, os agentes mais prevalentes foram a estreptomicina (20%), tetraciclina (12%), canamicina (12%), enrofloxacina (8%) e neomicina (4%). Os antimicrobianos amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, doxiciclina, florfenicol, gentamicina e a combinação de sulfametoxazol + trimetoprim apresentaram 100% de sensibilidade a todas as amostras.

Tabela 4 - Padrão de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 25 amostras de *P. multocida* isoladas de aves frente a 12 antimicrobianos.

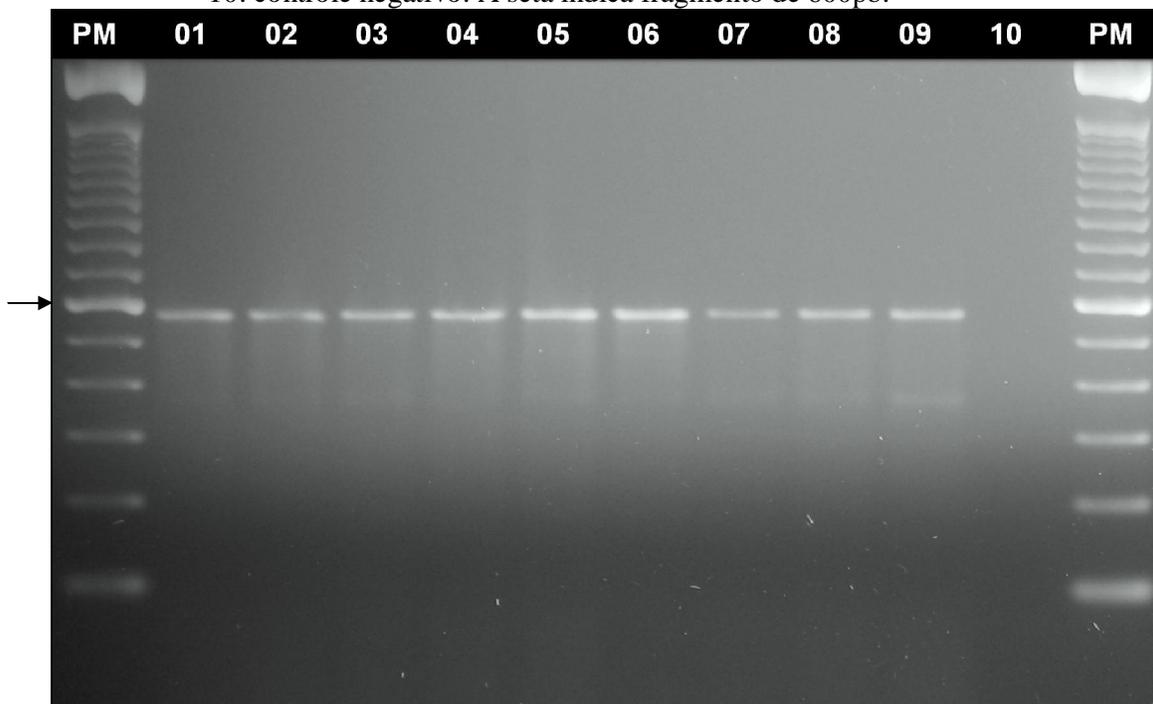
Agente antimicrobiano	Concentração (µg/disco)	Resistente (%)	Intermediário (%)	Sensível (%)
Amoxicilina	25	0,00	0,00	100,00
Ampicilina	10	0,00	0,00	100,00
Canamicina	30	0,00	12,00	88,00
Ceftiofur	30	0,00	0,00	100,00
Doxiciclina	30	0,00	0,00	100,00
Enrofloxacina	5	0,00	8,00	92,00
Estreptomicina	10	0,00	20,00	80,00
Florfenicol	30	0,00	0,00	100,00
Gentamicina	10	0,00	0,00	100,00
Neomicina	30 UI/disco	4,00	4,00	92,00
SXT ^d	23,75 + 1,25	0,00	0,00	100,00
Tetraciclina	30	8,00	12,00	80,00

^dSulfametoxazol + Trimetoprim (19:1)

4.2 Genes de virulência

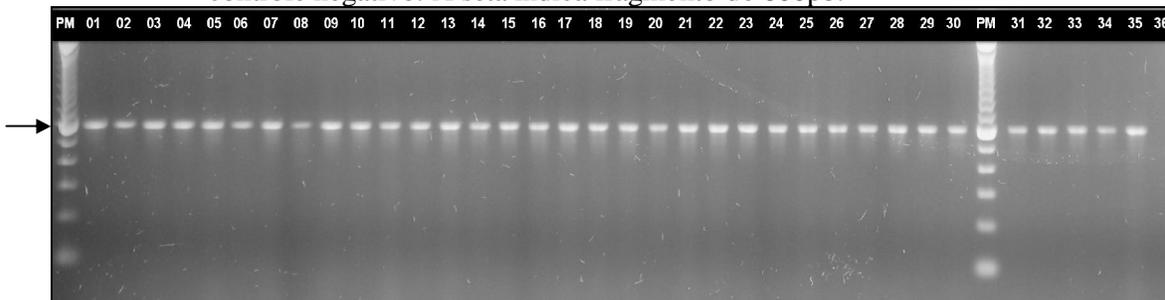
Através da técnica de PCR foi possível fazer a amplificação dos fragmentos dos genes *Pm0762* e *Pm1231*, conforme demonstram as figuras 2 e 3, respectivamente. Foram amplificados 567pb do gene *Pm0762* e 601pb do gene *Pm1231* das amostras de *P. multocida*. O PCR foi específico à região alvo selecionada, não ocorrendo a amplificação das amostras eleitas como controle negativo das reações (Figura 4 e 5). Todas as amostras, independente da origem, foram amplificadas para os dois genes analisados.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio com os produtos de amplificação do gene *Pm0762* (567pb). Legenda: PM: marcador de peso molecular (100pb); 01 a 06: amostras de *P. multocida*; 07: *P. multocida* ATCC 15742; 08: *P. multocida* ATCC 12945; 09: *P. multocida* ATCC 12946; 10: controle negativo. A seta indica fragmento de 600pb.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio com os produtos de amplificação compatíveis com o gene *Pm1231* (601pb). Legenda: PM: marcador de peso molecular (100pb); 01 a 31: amostras de *P. multocida*; 32: *P. multocida* ATCC 15742; 33: *P. multocida* ATCC 12945; 34: *P. multocida* ATCC 12946; 35: *P. multocida* ATCC 12946 (duplicata); 36: controle negativo. A seta indica fragmento de 600pb.



Fonte: Arquivo pessoal.

5 DISCUSSÃO

De modo geral, a *Pasteurella multocida* é suscetível à maioria dos agentes antimicrobianos amplamente utilizados na avicultura comercial contra as bactérias Gram negativas. Porém, é de se esperar que se encontre diferentes padrões de resistência em uma população animal. O nível de resistência das cepas varia conforme o hospedeiro, origem geográfica e tratamentos prévios com antimicrobianos.

A resistência de dado microrganismo à determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ou natural é aquela que faz parte das características naturais do microrganismo, sendo transmitida verticalmente de geração à geração. A resistência adquirida ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão. É uma nova característica manifestada no microrganismo, característica essa ausente nas células genitoras. Esta propriedade é resultado de diversos mecanismos genéticos de aquisição e de transferência de resistência determinada por alterações cromossômicas (transformação, transdução, transposição ou conjugação) ou extra-cromossômicas (plasmídeos). Uma única alteração genética pode levar ao aparecimento de um microrganismo resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (GOLD; MOELLERING, 1996; ALMEIDA; PALERMONETO, 2005).

No presente trabalho, as amostras de *P. multocida* foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados, sendo resistentes em 8% à tetraciclina e 4% à neomicina. Embora esta resistência apresentada seja aparentemente baixa, deve-se ter bastante critério ao interpretar esses resultados. Em função dos mecanismos genéticos de aquisição e transferência de resistência das bactérias e da velocidade com que ocorrem as trocas de material genético entre os microrganismos, o uso destes dois fármacos podem rapidamente selecionar as bactérias resistentes e, conseqüentemente, perder a eficácia ao longo do tempo. Portanto, não deverão ser escolhidos para o tratamento da cólera aviária (CA).

De acordo com o manual NCCLS (2003), a categoria intermediária é definida como a zona onde uma infecção causada por um determinado isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo, onde as drogas se concentram fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual; também indica uma “zona tampão” que deveria impedir que pequenos fatores técnicos e fora de controle causem grandes discrepâncias na interpretação dos testes. Devido às aves serem tratadas preferencialmente via água, é possível que algumas não sejam tratadas

adequadamente, portanto os fármacos que foram classificados nesta categoria (canamicina, enrofloxacina, estreptomicina, neomicina e tetraciclina) também devem ser evitados para o tratamento da CA.

Os sete agentes antimicrobianos que foram 100% sensíveis a todas as amostras (amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, doxiciclina, florfenicol, gentamicina e a combinação de sulfametoxazol + trimetoprim) é que deveriam ser eleitos para o tratamento da CA, neste caso. Como o tratamento com antimicrobianos tem custos elevados, a realização do antibiograma proporciona a escolha da droga mais econômica, além da eleição do fármaco ideal para o tratamento. Dos antimicrobianos sugeridos pela literatura, somente a combinação de sulfametoxazol + trimetoprim é que apresentou 100% de sensibilidade a todas as amostras.

Sellyei et al. (2009), caracterizaram a suscetibilidade antimicrobiana de 20 amostras de *P. multocida* isoladas de diferentes espécies de aves na Hungria e observaram que a maioria das amostras foram suscetíveis aos antibióticos, porém houve resistência à sulfonamida e SXT (20%), tetraciclina (15%), quinolonas de primeira geração (40%) e aminoglicosídeos (15%). Os autores acreditam que o crescente aumento da resistência à tetraciclina ao longo do tempo, deve-se ao uso excessivo deste antimicrobiano como agente terapêutico e promotor de crescimento.

Da mesma forma, um trabalho realizado nos Estados Unidos feito por Huang; Lin; Wu (2009), analisou 80 amostras de *P. multocida* frente a 14 antibióticos e evidenciou que somente dois antimicrobianos foram sensíveis a todas as amostras e que os demais apresentavam alguma resistência entre 1,25% e 6,25%.

Shivachandra et al. (2004), analisaram 123 amostras de *P. multocida* de diferentes espécies aviárias de diversos locais da Índia e determinaram a suscetibilidade antimicrobiana usando 20 antibióticos. Curiosamente, todas as amostras apresentaram resistência absoluta (100%) frente à sulfadiazina, sendo esta, uma das drogas de escolha para o tratamento da CA. A maioria das amostras apresentou sensibilidade intermediária. Nenhuma amostra foi 100% sensível a pelo menos um antimicrobiano. A tetraciclina apresentou resistência de 24,39%. O fármaco que foi selecionado e sugerido para o tratamento foi o cloranfenicol que apresentou 73,98% de sensibilidade.

Em 1997, uma pesquisa realizada nos países membros da União Européia e na Suíça, constatou que entre os agentes antimicrobianos utilizados na Medicina Veterinária, a tetraciclina era responsável por quase dois terços de todas as substâncias empregadas. O uso excessivo e indiscriminado de tetraciclina cria uma forte pressão seletiva, sob a influência de genes de resistência, que são trocados entre os membros de diferentes populações bacterianas.

A associação dos diversos genes de resistência à tetraciclina (*tet*) facilita a propagação destes genes de resistência entre as espécies, inclusive entre espécies de diferentes gêneros (KEHRENBURG et al., 2001b).

Estes estudos recentes demonstraram que conforme altera a região geográfica, os resultados divergem quanto à sensibilidade e à resistência das amostras aos antibióticos. Também reforçam a idéia de que nem sempre as drogas recomendadas pela literatura são as indicadas para todas as situações. A partir desses resultados, surge a necessidade de se realizar testes periódicos *in vitro* nas amostras de uma localidade específica para se ter conhecimento das características das cepas, possibilitando a seleção do melhor fármaco para cada situação.

A pesquisa de diferentes genes de virulência em *P. multocida* apresentou ampla evolução após a divulgação de toda a sequência genômica da bactéria (MAY et al., 2001). O interesse em identificar possíveis genes associados à virulência é em função de se conhecer os mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência e patogenicidade da bactéria (HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000).

A cápsula é o principal fator de virulência da *P. multocida*, porém diversos outros fatores contribuem para a infecção, tais como: lipopolissacarídeos, produção de endotoxinas, proteínas externas de membrana, sistemas de aquisição de ferro, proteínas de choque térmico, produção de neuraminidase e enzimas de clivagem de anticorpos (HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000; CHRISTENSEN; BISGAARD, 2000; EWERS et al., 2006; HARPER; BOYCE; ADLER, 2006). Os sistemas de aquisição de ferro são fundamentais para a sobrevivência dos microrganismos e May et al. (2001), identificaram mais de 50 genes possivelmente envolvidos com esses sistemas e com o metabolismo.

Ewers et al. (2006) investigaram a distribuição de 14 genes associados à virulência em 289 amostras de *P. multocida* isoladas de animais sadios e infectados e observaram que os genes de virulência estão amplamente distribuídos entre as cepas de diferentes hospedeiros independente do estado de saúde. De acordo com os resultados do trabalho, os genes *toxA*, *thpA* e *pflA* assim como os genes que participam na biossíntese da cápsula, são candidatos a importantes marcadores genéticos envolvidos na patogenicidade das cepas de *P. multocida*.

No presente trabalho, a detecção dos genes *Pm0762* e *Pm1231* através da técnica de PCR em 100% das amostras está em conformidade com o trabalho proposto por Liu; Lawrence; Austin (2004), tendo em vista que se trata de regiões espécie-específica.

Sabe-se que os genes *Pm0762* e *Pm1231* estão inseridos em uma região do genoma da *P. multocida* que possuem a função de fazer a regulação da transcrição, isto é, estes genes supostamente desempenham um papel importante na adaptação e na sobrevivência da

bactéria, pois regulam a expressão de outros genes. Devido à característica de serem encontrados exclusivamente em *P. multocida*, a detecção de fragmentos desses genes por PCR fornecem, de forma rápida e precisa, a diferenciação da *P. multocida* de outras bactérias. Dziva et al. (2008), comentam que a descoberta dessas novas regiões específicas de *P. multocida* poderão ser uma alternativa para tornar o diagnóstico da pasteurelose mais rápido e fácil.

Apesar de estar bem elucidado o papel dos genes reguladores da transcrição nos microrganismos, mais estudos devem ser realizados para fornecer maiores informações sobre o papel que os genes *Pm0762* e *Pm1231* exercem sobre o mecanismo molecular de virulência e patogenicidade da *P. multocida*.

Furian (2011) elaborou quatro ensaios de multiplex-PCR para detectar 15 genes (*ompH, oma87, sodA, sodC, hgbA, hgbB, exBD-tonB, nanB, nanH, pttA, pflA, toxA, hyaD-hyaC, bcbD, dcbF*) associados à virulência utilizando as mesmas amostras de *P. multocida* selecionadas para o atual trabalho. Os resultados do trabalho permitiram determinar a frequência dos genes e a distribuição de seis perfis genéticos nas amostras isoladas de aves.

6 CONCLUSÕES

1. As amostras foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados, porém foi observado certo grau de resistência antimicrobiana entre as amostras analisadas, principalmente com relação à tetraciclina e à neomicina. Os resultados sugerem que alguns cuidados devem ser tomados no uso da terapia antimicrobiana, a fim de reduzir a resistência bacteriana.

2. O antibiograma mostrou-se ser uma ferramenta simples e rápida de ser executada na rotina laboratorial, além disso, é extremamente útil para auxiliar na escolha do melhor fármaco para o tratamento da pasteurelose.

3. A detecção dos genes que regulam a transcrição (*Pm0762* e *Pm1231*) merece um estudo mais aprofundado para se aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de adaptação e sobrevivência da *P. multocida* levando a uma melhor compreensão sobre a regulação molecular associado à virulência e patogenicidade.

4. A associação das duas ferramentas empregadas neste trabalho (antibiograma e PCR) poderão contribuir para um controle mais eficaz e oferecer estratégias de prevenção contra a *P. multocida*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.T.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. // PALERMO-NETO, J. et al. (Ed.). **Farmacologia aplicada à avicultura – Boas práticas no manejo de medicamentos**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2005. cap. 10, p. 161–173.
- ALVES, M.C. **Identificação e efeitos das barreiras não-tarifárias às exportações brasileiras de carne de frango**. 2008. 132 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Economia Aplicada, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- BACK, A. Cólera aviária. In: **Manual de doença de aves**. 2. ed. Cascavel/PR: Integração, 2010. cap. 2, p. 127–131.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493–495, 1966.
- BISGAARD, M. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. **Zentralbl. Bakteriol**. v. 279, p. 7–26, 1993.
- BLACKALL, P.J.; CHRISTENSEN, H.; BECKENHAM, T.; BLACKALL, L.L.; BISGAARD, M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 353–362, 2005.
- BLACKALL, P.J.; MIFLIN, J.K. Identification and typing of *Pasteurella multocida*. A review. **Avian Pathology**. v. 29, p. 271–287, 2000.
- BRINGHENTI, J.D.M. **Aplicação de um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção da *Pasteurella multocida* isoladas de aves**. 2011. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**. v. 123, p. 20–30, 2010.
- CHRISTENSEN, J.P.; BISGAARD, M. Fowl Cholera. **Revue Scientifique et Technique del Office International des Epizooties**. v. 19, p. 626–637, 2000.
- DZIVA, F.; MUHAIRWA, A.P.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**. v. 128, p. 1–22, 2008.

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, p. 304–317, 2006.

FREDERIKSEN, W. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in man – an update. **Zentralbl. Bakteriol**. v. 279, p. 27–34, 1993.

FURIAN, T.Q. **Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Pasteurella multocida* através da técnica de Multiplex-PCR**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GLISSON, J. R.; HOFACRE, C.L.; CHRISTENSEN, J.P. Fowl Cholera. In: SAIF, Y.M. (Org.). **Diseases of Poultry**. 12th ed. Iowa: Blackwell, cap. 19, 2008. p. 739-758.

GOLD, H.S.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial-Drug Resistance. **The New England Journal of Medicine**. v. 355, p. 1445–1453, 1996.

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

HUANG, T.; LIN, T.L.; WU, C.C. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. **Avian Diseases**. v. 53, p. 89–93, 2009.

HUNT, M.L.; ADLER, B.; TOWNSEND, K.M. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**. v. 72, p. 3–25, 2000.

HUNT, M.L.; BOUCHER, D.J.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. In vivo-expressed genes of *Pasteurella multocida*. **Infection and Immunity**. v. 69, p. 3004–3012, 2001.

KEHRENBERG, C.; SCHULZE-TANZIL, G.; MARTEL, J.L.; CHASLUS-DANELA, E.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. **Veterinary Research**. v. 32, p. 323–339, 2001a.

KEHRENBERG, C.; SALMON, S.A.; WATTS, J.L.; SCHWARZ, S. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the *tex(H)* plasmid pMHT1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 48, p. 631–640, 2001b.

LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AUSTIN, F.W. Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 58, p. 263–267, 2004.

LIU, D.; SWIATLO, E.; AUSTIN, F.W.; LAWRENCE, M.L. Use of a putative transcriptional regulator gene as target for specific identification of *Staphylococcus epidermidis*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 43, p. 325–330, 2006.

NASCIMENTO, V.P.; GAMA, N.M.S.Q.; CANAL, C.W. Coriza infecciosa das galinhas, Pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. *In*. BERCHIERI JÚNIOR, A. *et al.* (Ed.). **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.5, p. 512-521.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standard M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2003.

PRODUÇÃO ANIMAL-AVICULTURA – A revista do Avisite. Campinas: Mundo Agro Editora Ltda., n. 49, ano V, maio/2011. ISSN 1983-0017.

ROSTAGNO, M.H. Impacto da restrição de antimicrobianos na indústria avícola. In: XII Simpósio Brasil Sul de Avicultura e III Brasil Sul Poultry Fair, 2011, Chapecó/SC. **Anais**. Associação Catarinense de Medicina Veterinária – Núcleo Oeste, Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. p. 121–132.

RYU, E. Studies on *Pasteurella multocida*. VI. The relationship between inhibitory action of blood and susceptibility of animals to *Past. multocida*. **Japanese Journal of Veterinary Science**. v. 23, p. 357–361, 1961.

SELLYEI, B.; VARGA, Z.; SZENTESI-SAMU, K.; KASZANYITZKY, E.; MAGYAR, T. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 57, p. 357–367, 2009.

SHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A.A.; BISWAS, A.; RAMAKRISHNAN, M.A.; SINGH, V.P.; SRIVASTAVA, S.K. Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida*. **Tropical Animal Health and Production**. v. 36, p. 743–750, 2004.

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 and Infectious Diseases**. v. 31, p. 47–62, 2008.

SHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A.A.; GAUTAM, R.; JOSEPH, S.; SAXENA, M.K.; CHAUDHURI, P.; SRIVASTAVA, S.K. Characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* by restriction endonuclease and amplified fragment length polymorphism. **Research in Veterinary Science**. v. 81, p. 8–18, 2006.

SPINOSA, H.S.; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. Antimicrobianos: Considerações Gerais. *In*. PALERMO-NETO, J. *et al.* (Ed.). **Farmacologia aplicada à avicultura – Boas práticas no manejo de medicamentos**. 1. ed. São Paulo: ROCA, 2005. cap. 6, p. 87-103.

TAMURA, H.; YAMADA, A.; SAITO, H.; MURAI, S.; KATO, H. Identification of another surface protein antigen I/II gene, *paaB*, and a putative transcriptional regulator gene, *par*, from *Streptococcus cricetus*. **Genes & Genetic Systems**. v. 79, p. 129–137, 2004.

TOWNSEND, K.M.; FROST, A.J.; LEE, C.W.; PAPADIMITRIOU, J.M.; DAWKINS, H.J. Development of PCR assays for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 36, n. 4, p. 1096–1100, 1998.

TURRA, F. S. **Cenários e Rumos das Exportações do Agronegócio**. Bento Gonçalves: Avisulat, 2010. Palestra proferida em 19/10/2010.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2010/2011**. São Paulo: UBABEF, 2011.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**. v. 406, p. 775–781, 2000.