

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

**Estabelecimento de um Índice de Patogenicidade em pintos de corte de um dia de idade para amostras de *Pasteurella multocida* de aves e suínos.**

**Dissertação de Mestrado**

**Roberta Marmitt Pilatti**

**Porto Alegre**

**2014**

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

**Estabelecimento de um Índice de Patogenicidade em pintos de corte de um dia de idade para amostras de *Pasteurella multocida* de aves e suínos.**

**Autora: Roberta Marmitt Pilatti**

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

**Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes**

**Co-orientador: Benito Guimarães de Brito**

**Porto Alegre**

**2014**

## CIP - Catalogação na Publicação

PILATTI, ROBERTA MARMITT

Estabelecimento de um Índice de Patogenicidade em pintos de corte de um dia de idade para amostras de *Pasteurella multocida* de aves e suínos. / ROBERTA MARMITT PILATTI. -- 2014.  
61 f.

Orientador: HAMILTON LUIZ DE SOUZA MORAES.  
Coorientador: BENITO GUIMARÃES DE BRITO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. patogenicidade. 2. pintos. 3. *Pasteurella multocida*. 4. índice. 5. aves e suínos. I. MORAES, HAMILTON LUIZ DE SOUZA, orient. II. BRITO, BENITO GUIMARÃES DE, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**ROBERTA MARMITT PILATTI**

**ESTABELECIMENTO DE UM ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM PINTOS  
DE CORTE DE UM DIA DE IDADE PARA AMOSTRAS DE *PASTEURELLA*  
*MULTOCIDA* DE AVES E SUÍNOS.**

**Aprovada em 26/02/2014, por:**

---

**Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes**

**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle**

---

**Prof. Dr. Luís Cesar Bello Fallavena**

---

**Prof. Dr. Lucas Brunelli de Moraes**

**À minha mãe e meu pai, exemplos de sabedoria,  
persistência, paciência e amor incondicional.**

**Aos amigos, pelo apoio, risos e choros divididos,  
pelos ensinamentos e pela amizade.**

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

À minha colega e amiga Diane Alves de Lima, pelas risadas, choros, dúvidas divididas, pelos seus muitos bolos embatumados e pelo seu amável ombro amigo em todas as ocasiões.

Ao meu noivo, Ulisses Lopes, pelo apoio incondicional, paciência, pelas muitas saladas de frutas divididas e pelas caminhadas noturnas para me buscar no centro da cidade.

À minha família portoalegrense: Cenira, Alberto e Paula Blume, pelo acolhimento, pelos risos e mates em família.

Ao Dr. Benito Guimarães de Brito, pela cessão das estruturas onde este estudo foi realizado.

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

## RESUMO

*Pasteurella multocida*, apesar de ser uma bactéria que compõe a microbiota respiratória, sob algumas circunstâncias pode manifestar-se como um agente patogênico primário ou secundário, causando doença em aves e outros animais. Como agente primário, *P. multocida* leva a grandes perdas econômicas, causando cólera em aves, rinite atrófica em suínos e septicemia hemorrágica em bovinos e bubalinos. *P. multocida* é uma espécie heterogênea, e a patogenicidade dos isolados pode ser amplamente variável. A suscetibilidade do hospedeiro à essas cepas varia consideravelmente entre espécies. Inoculações experimentais de *P. multocida* em camundongos e aves são comumente usadas para avaliar a patogenicidade de diferentes cepas, mas os resultados são geralmente subjetivos e pouco mensuráveis. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma nova metodologia para classificar a patogenicidade de cepas de *P. multocida*, através da formulação de um índice padrão. Para determinar esse índice, foram usadas 97 amostras de *P. multocida*, isoladas de cólera em aves e rinite em suínos. Cem microlitros ( $10^5$  UFC) de uma cultura bacteriana contendo  $10^6$  UFC/mL, de cada isolado de *P. multocida* foram inoculados, por via intraperitoneal, em 10 pintos de um dia. Além da mortalidade causada pela inoculação, o tempo de morte e as lesões macroscópicas foram avaliados. Diferenças significativas foram observadas entre isolados de aves e suínos em relação aos índices de patogenicidade. O número de lesões e a porcentagem de bactérias recuperadas dos animais inoculados também variaram de acordo com a origem do isolado. A partir dos índices observados, os isolados foram distribuídos em três classes de patogenicidade: alta, média e baixa. O índice de patogenicidade desenvolvido neste trabalho permite a mensuração e classificação da patogenicidade de isolados de *P. multocida* e pode ser uma alternativa aos modelos subjetivos de triagem de patogenicidade usados até o momento.

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

## ABSTRACT

*Pasteurella multocida*, despite being a bacteria that makes up the respiratory microbiota, under some circumstances can manifest as primary or secondary pathogenic agent, causing disease in birds and other animals. As primary agent, *P. multocida* leads to large economic losses, causing fowl cholera in birds, atrophic rhinitis in swine and haemorrhagic septicemia in cattle and buffalos. *P. multocida* is a heterogeneous specie, and the pathogenicity of the samples can be widely variable. Host susceptibility to these strains varies considerably between species. Experimental inoculations of *P. multocida* in mice and birds are commonly used to evaluate the pathogenicity of the different strains, but the results are generally subjective and difficult to evaluate them. The aim of this work was to establish a new methodology to classify the pathogenicity of a specific strain, through the formulation of a standard score. To determine this score, we used 97 samples of *P. multocida*, from fowl cholera in birds and rhinitis in swine. One-hundred microliters ( $10^5$  CFU) of bacterial culture containing  $10^6$  CFU/mL of each *P. multocida* isolate were inoculated, by intraperitoneal route, in 10 one-day-old chicks. Besides mortality caused by the inoculation, time of death and gross lesions were also evaluated. Significant differences were observed between avian and swine isolates in relation to pathogenicity scores. The number of lesions and the percentage of bacteria recovered from the inoculated animals also varied according to the origin of the isolate. From the observed scores, the isolates were distributed into three pathogenicity classes: high, medium and low. The pathogenicity score developed here allows the measurement and classification of the pathogenicity of *P. multocida* isolates and can be an alternative to subjective current models of pathogenicity screening used so far.

Key-words: *Pasteurella multocida*, pathogenicity indices, chickens.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação entre o tempo de morte e valor atribuído ao FBS e relação entre o número de lesões e o respectivo valor atribuído.....	34
Tabela 2.	Representação da execução do cálculo do Índice de Patogenicidade por amostra bacteriana.....	35
Tabela 3.	Distribuição percentual das mortalidades diárias para as diferentes origens das amostras.....	38
Tabela 4.	Medianas das lesões nos grupos de 10 aves inoculadas de acordo com a origem das amostras.....	39
Tabela 5.	Medianas dos percentuais de reisolamento bacteriano das diferentes origens das amostras.....	41
Tabela 6.	Medianas dos percentuais de reisolamento bacteriano versus o dia de reisolamento.....	41
Tabela 7.	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a origem das amostras.....	42
Tabela 8.	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das amostras de origem aviária e suína nos grupos de patogenicidade.....	43
Tabela 9.	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das amostras de origem aviária nos grupos de patogenicidade.....	44
Tabela 10.	Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das amostras de origem suína nos grupos de patogenicidade.....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Alojamento das aves em caixas de contenção e dispersão das caixas na sala de isolamento.....	28
Figura 2.	Técnica de contagem de UFCs através da técnica da gota.....	30
Figura 3.	Processo de inoculação por via intraperitoneal dos pintos de um dia.....	31
Figura 4.	Lesões macroscópicas presentes nas observações das aves necropsiadas.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AD	Ágar Amido Dextrose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Ágar Sangue
ASS	Aerossaculite
BHI	<i>Brain- Heart Infusion</i>
CA	Cólera Aviária
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CL	Celulite
DL <sub>50</sub>	Dose Letal para matar 50% dos animais
DP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	Fator de Bonificação de Sobrevivência
GAG's	Glicosaminoglicanos
IP	Índice de Patogenicidade
IPI	Índice de Patogenicidade Individual
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LPS	Lipopolissacarídeos
kg	Quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MTM	Média do Tempo de Morte
N°	Número
OIE	Organização dos Estados Internacionais
OMP	<i>Outer Membrane Proteins</i>
ONF	Onfalite
pi	Pós inoculação
PC	Pericardite

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PH	Perihepatite
ppb	Partes por bilhão
PT	Peritonite
RA	Rinite Atrófica
SARP	Soroaglutinação Rápida em Placa
SIF	Sistema de Inspeção Federal
SH	Septicemia Hemorrágica
TM	Tempo de Morte
TSA	Ágar <i>Tripcase</i> de Soja
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Histórico da <i>Pasteurella multocida</i> .....	14
2.2	Características morfológicas e bioquímicas.....	14
2.3	<i>Pasteurella multocida</i> em aves.....	16
2.4	Patogenia.....	18
2.4.1	Sinais de infecção aguda.....	19
2.4.2	Sinais de infecção crônica.....	19
2.4.3	Lesões macroscópicas.....	20
2.5	Fatores de virulência.....	20
2.5.1	Cápsula.....	21
2.5.2	Lipopolissacarídeos (LPS).....	22
2.5.3	Fímbrias, adesinas e proteínas de membrana externa (OMPs).....	22
2.6	Métodos de diagnóstico e de estudos de patogenicidade.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	27
3.1	Comitê de Ética no Uso de Animais.....	27
3.2	Local de estudo.....	27
3.3	Aquisição e manutenção das aves.....	27
3.4	Amostras.....	28
3.5	Dose Letal 50%.....	29
3.6	Preparo do inóculo.....	29
3.7	Inoculação.....	30
3.8	Mortalidade, avaliação de lesões macroscópicas e reisolamento bacteriano.....	31
3.9	Cálculo do Índice de Patogenicidade.....	33
3.10	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Relação da mortalidade com o tempo de morte avaliado.....	37
4.2	Presença de lesões e reisolamento bacteriano.....	39
4.3	Índices de Patogenicidade.....	42
4.4	Resultados sorológicos.....	45

5	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS .....	48
	APÊNDICE A. Protocolo de aprovação do CEUA/IPVDF.....	I
	APÊNDICE B. Resultados de análise de micotoxinas (aflatoxinas) na ração fornecida às aves do estudo.....	II
	APÊNDICE C. Laudo dos resultados sorológicos.....	III
	APÊNDICE D. Distribuição das amostras de <i>Pasteurella multocida</i> e seus respetivos índices de patogenicidade.....	IV

## 1 INTRODUÇÃO

O atual panorama econômico brasileiro configura nosso país como um dos mais produtivos do mundo no setor alimentício. As últimas três décadas foram responsáveis pelos principais investimentos nos setores agroindustriais no Brasil, iniciando-se pela expansão das áreas agricultáveis e plantadas, conjuntamente com a ampliação das políticas econômicas e sociais para a elevação e a consolidação do número de produtores de grãos e de proteínas de origem animal.

No setor de proteína animal, a produção avícola é a que mais exporta e a que mais cresce no país. Contudo, durante o ano de 2012, intempéries prejudicaram a agricultura, principalmente das culturas do milho e da soja, assim resultando em um incremento nos custos de produção do setor, sobretudo no que tange aos custos relacionados à ração.

Neste contexto, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA- *United States Department of Agriculture*) estimou que a produção de carne de frango brasileira no ano de 2013 aumentaria somente 1%, ficando em torno de 12,770 milhões de toneladas. Em 2014, o USDA projeta que a avicultura nacional poderá vir a crescer 3%, ultrapassando a faixa dos 13 milhões de toneladas de carne de frango produzidas (USDA, 2013).

Do volume total de frangos produzido pelo país em 2012, 69,01% foi destinado ao consumo interno e 30,98% para o mercado externo. Com isto, o consumo per capita de carne de frango foi de 45,0 kg/habitante/ano, número que representa uma diminuição de 2,4 kg em relação ao ano anterior. (UBABEF, 2013).

Além de buscar a melhoria dos índices zootécnicos, a avicultura nacional preocupa-se em oferecer alimentos seguros e saudáveis para o consumo. Desta maneira, os sistemas de produção nacionais são exclusivamente confinados e buscam um alto nível de biossegurança.

Para garantir a inocuidade dos alimentos os programas de controle de qualidade alimentar brasileiros têm melhorado constantemente, e as monitorias e protocolos de gerenciamento de patógenos têm sido frequentemente atualizados para um acesso mais rápido e fácil ao diagnóstico e contenção de surtos de doenças.

A bactéria *Pasteurella multocida* é um habitante comensal do trato respiratório e digestivo de animais saudáveis. Fatores de estresse podem diminuir a resistência dos animais e a multiplicação destes micro-organismos podem resultar em um processo infeccioso. Desta maneira, *P. multocida* geralmente é classificada como agente secundário a outras enfermidades. Além disto, também é o agente causador de numerosas doenças de relevância econômica, como a pneumonia enzoótica em bovinos e ovinos, a septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos, a rinite atrófica em suínos, a pasteurelose em coelhos e a cólera aviária.

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

O diagnóstico confirmatório da doença e a detecção de *P. multocida* dependem do isolamento e da identificação do organismo suspeito. A utilização de modelos animais, como camundongos, para a confirmação do diagnóstico é usual. No entanto, devido aos custos de manutenção, à necessidade de treinamento para a manipulação dos animais, além da questão do bem-estar animal, novas alternativas para estas metodologias são necessárias. Outra dificuldade enfrentada na utilização deste modelo é a falta de padrão para a avaliação macroscópica de diferentes indicadores de patogenicidade.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo de classificação da patogenicidade de *Pasteurella multocida* isoladas de aves e de suínos, através da inoculação em pintos de corte de um dia de idade.

Fazendo parte de uma pesquisa ainda maior, que busca não mais utilizar modelos animais no diagnóstico microbiológico, associando os índices de patogenicidade delineados neste experimento ao perfil genético das mesmas amostras aqui utilizadas, através de redes neurais preditivas que após serem supridas com os dados que estão sendo gerados, poderá prever a capacidade patogênica das amostras com boas probabilidades de acerto, com a mesma metodologia delineada por Souza (2010) para as amostras bacterianas de *Escherichia coli*.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Histórico da *Pasteurella multocida*

Em meados do século XVII, Antony Van Leeuwenhoek, (1632-1723) e Robert Hooke (1635-1703) desenvolveram sistemas simples e compostos de lentes de vidro polido que, apesar de rudimentares, tornaram possível visualizar pequenos seres vivos de dimensões microscópicas (NEVES, 2008). Em 1877 e 1878 Perroncito, na Itália e Semmer na Rússia, observaram em tecidos de aves infectadas uma bactéria que apresentava uma forma arredondada e ocorria sozinha ou em pares. Em 1879, Toussant isolou a bactéria e provou que *P. multocida* era a única causa da enfermidade das aves avaliadas em seu estudo (GLISSON, et al., 2008a). Chabert (1782) e Maillet (1836) foram os primeiros pesquisadores a utilizarem o termo “cólera aviária”.

No passado, a bactéria *P. multocida* apresentou várias denominações, incluindo-se *Bacillus cholerae gallinarum*, *P. cholerae-gallinarum*, *Coccobacillus avicidus*, *P. avicida*, *Bacterium multacidum*, *P. avium*, *Bacterium avisepticus*, e *P. aviseptica* (GLISSON et al., 2008a). A denominação *Pasteurella multocida* foi proposta por Rosenbusch e Merchant em 1939, e é aceita como o nome oficial no *Manual Bergey's* (WHITMANN, 1957). O gênero *Pasteurella* foi assim designado para homenagear Louis Pasteur, grande estudioso que em meados de 1880 foi o primeiro a reconhecer a bactéria como agente causador de uma doença fatal em galinhas. Além disto, Pasteur também demonstrou em seus estudos que cepas atenuadas de *P. multocida* poderiam ser utilizadas como vacinas vivas para estimular a imunidade contra a doença (BOYCE et al., 2010).

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

### 2.2 – Características morfológicas e bioquímicas

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

subespécies microbianas (GANDRA, 2008). A *Pasteurella sp* é uma bactéria Gram negativa, com característica bipolar que pode ser observada ao microscópio óptico após as colorações de Giemsa ou Wright, especialmente em tecidos. Não forma endósporos, não é móvel e não apresenta acidificação rápida. São geralmente cocobacilos ou células arredondadas que ocorrem sozinhas, em pares ou menos frequentemente em curtas cadeias, dependendo do estágio de crescimento (BACK, 2004; DZIVA, 2008; CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006; NASCIMENTO, 2009; BOYCE et al., 2010).

O isolamento primário de *P. multocida* pode ser dificultado pela competição com micro-organismos da microflora do hospedeiro e os meios de cultura seletivos não apresentam amplas aplicações para esta bactéria (DZIVA et al., 2008). Por outro lado, a inoculação do material suspeito em camundongos e a subsequente coleta de órgãos como baço, fígado, coração, pulmões e sangue cardíaco aumentam a probabilidade de isolamento de *P. multocida* (DZIVA et al., 2006; MOHAMED et al., 2012).

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

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

As colônias de *P. multocida*, em placas de ágar sangue geralmente são de cor acinzentada, não-hemolíticas, mucoides ou não-mucoides e apresentam um típico cheiro adocicado de indol. As colônias são circulares, levemente elevadas e regulares com uma margem inteira. A sua superfície é geralmente lisa, brilhante e não-transparente (WOO et al., 2006; DZIVA et al., 2008; CHRISTENSEN e BISGAARD, 2008; GLISSON et al., 2008b). Todavia, maiores variações na morfologia das colônias têm sido observadas e algumas são relacionadas com o hospedeiro. Por exemplo, colônias mucoides geralmente são obtidas de lesões de pneumonia em bovinos, suínos e coelhos, enquanto as colônias não-mucoides são comumente observadas quando isoladas de aves. As colônias de *P. multocida* não apresentam  $\beta$ -hemólise e possuem diâmetro de 0,5 a 2 mm, após 24 horas

de incubação à 37°C (CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006). O crescimento em caldo usualmente causa turbidez, mas crescimento granular também pode ocorrer. (MUTTERS et al., 2003).

A maioria das amostras de *P. multocida* apresenta um polissacarídeo capsular. A antigenicidade da cápsula pode ser utilizada para identificar cinco sorogrupos A, B, D, E e F. A predileção da doença pelo hospedeiro é geralmente relatada ao sorogrupo, como exemplo as cepas envolvidas em casos de septicemia hemorrágica pertencem aos sorogrupos B ou E, por outro lado, os isolados de cólera aviária pertencem ao grupo A (MUTTERS et al., 1989; BOYCE et al., 2000; CHUNG et al., 2001; BACK, 2004, HARPER et al., 2006, EWERS et al., 2006).

Em 1952, Carter desenvolveu o primeiro teste sorológico de hemoaglutinação passiva baseado na identificação dos antígenos capsulares e dos cinco sorogrupos (A, B, D, E e F) (CARTER, 1955; GLISSON et al., 2008b; NASCIMENTO et al., 2009; BOYCE et al., 2010);

O segundo método sorológico foi desenvolvido por Heddleston et al. em 1972. É um teste de imunoprecipitação por gel difusão que classifica as cepas em 16 diferentes sorotipos baseados na presença dos antígenos do lipopolissacarídeo (LPS) (HEDDLESTON et al., 1972; NASCIMENTO et al., 2009; BOYCE et al., 2010).

O sistema padrão de sorotipificação para *P. multocida* engloba ambos os testes sorológicos (Carter e Heddleston), sendo que na sua nomenclatura de classificação o sorotipo capsular consta primeiro, seguido pela identificação dos antígenos somáticos (ex: A:1 – sorogrupo capsular A, e sorotipo LPS tipo 1) (BOYCE et al., 2010).

Embora o diagnóstico bacteriológico confirme o isolamento de *P. multocida*, a sua presença não pode ser associada com a doença sem a observação de sinais clínicos e ou de lesões macroscópicas, pois a bactéria é comensal do trato respiratório superior das aves e dos mamíferos (SONGSERN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2009).

### **2.3 – *Pasteurella multocida* em aves**

As bactérias pertencentes ao gênero *Pasteurella* podem ser agentes primários ou patógenos oportunistas quando associados a outras doenças. A *Pasteurella multocida* é uma espécie comumente associada com doenças de importância econômica para animais

de produção, causando Cólera Aviária (CA) nas aves, Septicemia Hemorrágica (SH) em bovinos e búfalos, Rinite Atrófica (RA) em suínos e Pasteurelose em coelhos (DZIVA et al., 2008; BOYCE et al., 2010; HUBERMAN et al., 2011).

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

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

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

A disseminação de *P. multocida* entre os lotes está primariamente envolvida com excreções orais, nasais e conjuntivais de aves doentes que contaminam o meio ambiente, principalmente ração e água (GLISSON, 2008b). Carreadores saudáveis ou infecções latentes são comuns e desempenham um importante papel na epidemiologia da doença (DZIVA, et al., 2008).

Em casos clínicos agudos, a mortalidade das galinhas gira em torno de 0 a 20%, sendo que perdas maiores podem ser relatadas. Redução na produção de ovos e a persistência da infecção localizada frequentemente ocorrem (GLISSON et al., 2008b).

## 2.4 - Patogenia

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

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

Aparentemente, animais saudáveis podem manter populações de *P. multocida* na mucosa da orofaringe por longos períodos, mas os mecanismos precisos pelos quais a bactéria consegue invadir e colonizar os pulmões ou outros tecidos não é conhecido (DE ALWIS, et al., 1990 apud BOYCE, et al., 2010; MUHAIRWA, 2000). Normalmente, a bactéria não ultrapassa o epitélio ou a mucosa do trato gastrointestinal de aves, mas prontamente coloniza o trato respiratório baixo se inoculada na traqueia (WILKIE et al., 2000 apud BOYCE, et al., 2010). Em mamíferos, a colonização do tecido pulmonar geralmente requer fatores predisponentes, como uma infecção viral ou uma infecção por *Mycoplasma* spp. O estresse pode causar alterações em animais previamente saudáveis, situação que precede a invasão e a infecção sistêmica (BOYCE et al., 2010).

A doença ocorre devido a rápida invasão do hospedeiro, com o agente multiplicando-se em diferentes tecidos, até que ocorra uma septicemia. A virulência das cepas que causam a CA está relacionada à habilidade da bactéria em resistir à fagocitose no interior dos tecidos. Quando o micro-organismo atinge um grande número, é provável que ocorra autólise e endotoxinas sejam liberadas em quantidade suficiente para causarem lesões aos tecidos do hospedeiro (NASCIMENTO, 2009).

A doença usualmente ocorre em duas formas, uma septicêmica e aguda, com altas taxas de morbidade e de mortalidade e outra crônica caracterizada por uma infecção

localizada das articulações e dos seios nasais (RHOADES e RIMLER, 1991 apud AMONSIN, 2002).

#### **2.4.1 - Sinais de infecção aguda**

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

Os sinais clínicos que ocorrem frequentemente são febre, anorexia, penas arrepiadas, descarga oral, diarreia inicialmente esbranquiçada e posteriormente aquosa e/ou verde mucoide, além do aumento da taxa respiratória e cianose de crista e barbelas nos períodos próximos à morte (BACK, 2004; GLISSON et al., 2008b; NASCIMENTO et al., 2009).

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

#### **2.4.2 - Sinais de infecção crônica**

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

### 2.4.3 – Lesões macroscópicas

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

### 2.5 – Fatores de virulência

As bactérias, através da evolução, desenvolveram diferentes estratégias para evadirem dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A palavra patogenicidade descreve a gama de todas as características de um micro-organismo que desenvolvem um papel na infecção (KUBATZKY, 2012).

As primeiras definições de virulência derivam de antigos estudos de clássicos patógenos bacterianos a partir do emprego dos Postulados de Koch (BOERLIN, 2010). O termo virulência descreve o grau de patogenicidade de um micro-organismo específico (KUBATZKY, 2012).

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

### 2.5.1 – Cápsula

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

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

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

Entre as possíveis funções da cápsula, citam-se a proteção contra dissecação no meio ambiente, a fagocitose e a inibição do sistema complemento do soro (CHUNG et al., 2001). Estudos prévios sobre a virulência da cápsula de *P. multocida* têm usado derivados espontâneos de variantes acapsulares ou a remoção enzimática da cápsula (PRUIMBOOM, 1996 apud CHUNG et al, 2001; SAMBROOK, 1989 apud CHUNG et al, 2001). Estes estudos sugerem que há uma correlação entre a cápsula e a virulência de *P. multocida* (CHUNG et al., 2001). Contudo, a análise de parte destes estudos é prejudicada pela falta da seleção de amostras isogênicas e um não entendimento da síntese da cápsula em nível molecular (MUTTERS et al., 1989; BOYCE et al., 2000; CHUNG et al., 2001; BACK 2004, HARPER et al., 2006, EWERS et al., 2006).



### 2.5.2 – Lipopolissacarídeos (LPS)

LPS são componentes típicos da parede celular de patógenos Gram negativos e atuam em dois papéis proeminentes: como fator de virulência e como imunógeno sorovar-específico. São considerados endotoxinas, pois apresentam pirógenos exógenos que podem ocasionar febre (KUBATZKY, 2012).

Endotoxinas são produzidas por todas as cepas de *P. multocida*, tanto virulentas quanto não virulentas. Apesar de contribuírem para a virulência, a invasão e multiplicação das cepas são necessárias para a produção de quantidade suficiente de endotoxinas *in vivo* (GLISSON et al., 2008a). A toxicidade depende da interação entre a endotoxina e o hospedeiro, pois as diferenças estruturais entre os sorotipos de LPS pode afetar a intensidade da resposta imune inata (BOYCE et al., 2010).

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

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

O mecanismo molecular fundamental da aderência de *P. multocida* nas células do hospedeiro ainda não é conhecido (DABO et al., 2003). Alguns micro-organismos necessitam da motilidade e de quimiotaxia, assim como de resistência ao ácido gástrico e à bile para alcançar as células alvo no hospedeiro. O contato inicial é geralmente mediado pela bactéria patogênica através de adesinas fimbriais ou não fimbriais na sua superfície (KLINE et al., 2009 apud GYLES e PRESCOTT, 2010). A ligação pode resultar em colonização extracelular ou na internalização do patógeno. As adesinas se ligam a receptores C de superfície das células do hospedeiro. O tipo de órgão e hospedeiro envolvidos podem determinar diferenças na capacidade de adesão entre as células animais e os receptores para as adesinas bacterianas (GYLES e PRESCOTT, 2010).

As fímbrias desenvolvem um papel na adesão às superfícies, e algumas cepas de *P. multocida* do sorogrupo A são hábeis na adesão ao epitélio das mucosas (HARPER et al., 2006). Fímbrias tipo IV, ou Pili, isoladas dos sorotipos A, B e D de *Pasteurella*

*multocida*, e associadas com a virulência em outras bactérias, são geralmente as mais estudadas (RUFFOLO et al., 1997; HARPER, 2006).

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

A proteína de membrana OmpH é uma das maiores proteínas de membrana descritas em *P. multocida*. Trabalhos vinculados à imunidade demonstram que esta proteína possui antígenos bacterianos que auxiliam a iludir a resposta imune do hospedeiro (LUO et al., 1999 apud BOYCE, 2006). A expressão de OMP's pela *P. multocida* é influenciada pelos níveis de ferro, e reações cruzadas entre anticorpos de suínos e de aves (ZHAO et al., 1995 apud CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006).

## **2.6 – Métodos de diagnóstico e de estudos de patogenicidade**

O diagnóstico presuntivo de CA pode ser baseado na ocorrência de sinais clínicos e de lesões típicas e/ou na demonstração microscópica da coloração bipolar característica da bactéria em amostras de tecidos como fígado, baço ou em esfregaços de sangue (SHIVACHANDRA et al., 2003; FERRI et al., 2006).

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

A detecção de *P. multocida*, por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) também consiste em uma importante ferramenta para o rápido diagnóstico e para direcionar as ações a serem tomadas em casos confirmados (DZIVA et al., 2008; BRINGHENTI, 2011; FURIAN et al., 2013).

O diagnóstico sorológico através de soroaglutinação rápida (SARP), imunodifusão ou teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) podem apresentar resultados confusos em algumas situações. Por exemplo, nos casos de CA crônica, quando os níveis de anticorpos apresentam-se em quantidades não suficientes para um diagnóstico positivo, e também pode apresentar pequeno valor nos casos agudos, quando não houve tempo para a formação de uma resposta imune mensurável (NASCIMENTO et al., 2009).

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

Ensaio experimentais com a utilização de galinhas, camundongos ou ovos férteis de galinhas têm sido amplamente utilizados em estudos de patogenicidade de *P. multocida* (IBRAHIM et al., 1998; SHIVACHANDRA et al., 2006). Tais estudos também avaliam diferentes rotas de inoculação, como as vias intramuscular, intratraqueal, intravenosa e conjuntival para se tentar esclarecer a porta de entrada da bactéria durante os casos de CA (WILKIE et al., 2000).

Camundongos são altamente susceptíveis à bactéria *P. multocida* (PATEL, 2004). Kumar *et al.* (1996) testaram 43 isolados de *Pasteurella multocida* de diferentes espécies animais. O teste de patogenicidade foi realizado em três camundongos para cada amostra, pela inoculação de 0.2 mL de um caldo de cultura de 18 horas pela via intraperitoneal e observados durante 48 horas. Todos os 43 isolados mataram os camundongos dentro do período de 24 a 48 horas, e a bactéria foi reisolada do sangue cardíaco dos animais, e confirmado o diagnóstico através do cultivo bacteriano, de testes bioquímicos e de testes sorológicos.

Rajini *et al.* (1995) realizaram um teste de patogenicidade de 30 amostras coletadas de aves suspeitas de CA. Os materiais coletados de cada ave foram homogeneizados e 0,1 mL de cada amostra foram inoculados por via intraperitoneal em camundongos. As amostras de todas as aves foram letais para os camundongos, embora tenha havido variação nas suas virulências, de acordo com a análise da Média do Tempo de Morte (MTM). As cepas com uma MTM de 10 horas foram consideradas as mais

virulentas. A maioria dos isolados (19) mostrou uma MTM entre 10 e 18 horas e apenas um isolado apresentou uma baixa virulência com um MTM de 25 a 30 horas.

Balakrishnan e Mini (2001 apud PATEL, 2004) realizaram um teste de patogenicidade com 4 isolados provenientes de patos e de galinhas a partir da inoculação de camundongos, coelhos, galinhas e patos. O teste de patogenicidade dos isolados resultou na morte de todos os camundongos em 24-48 horas, não havendo classificação de patogenicidade das 4 cepas.

Hunter e Wobeser (1980 apud PATEL, 2004) induziram experimentalmente CA em patos para estudar a ocorrência de lesões decorrentes da infecção. Patos que morreram em função de condições agudas de CA tiveram lesões de septicemia hemorrágica com amplo dano vascular e necrose focal no fígado, baço e intestinos. Os animais que sobreviveram ao desafio desenvolveram lesões crônicas em vários órgãos, incluindo o cérebro, intestinos, sacos aéreos, articulações e olhos.

Verma (1991) isolou *P. multocida* de um caso de pasteurelose suína e realizou o teste de patogenicidade em bezerros, porcos, ovelhas, cabras, coelhos, galinhas, patos e pombos por via subcutânea. Somente as galinhas e os patos foram resistentes ao desafio. Os animais mortos foram submetidos a avaliação das lesões macroscópicas. Foram observadas hemorragias em todos os órgãos vitais como fígado, baço, rins, linfonodos e músculo cardíaco.

Nakamine et al. (1992) obteve dois isolados de patos selvagens de *P. multocida* no Japão e realizou um teste de patogenicidade em coelhos por via subcutânea. Os animais morreram em um período de 24 horas. Foram observadas múltiplas necroses e agregados bacterianos proeminentes, particularmente no fígado.

Sood et al.(2006) inocularam 0,2 mL de uma solução contendo  $10^{7,23}$  UFC/mL de *P. multocida* por via intravenosa em aves com 12 a 15 semanas de vida da linhagem Leghorn. As aves desafiadas apresentaram congestão intestinal, hepática, esplênica, renal e cardíaca, além de petéquias equimóticas na superfícies cardíaca e no esôfago. .

Em seu estudo, Huberman et al. (2011) utilizaram 5 amostras de *P. multocida* provenientes de aves e inocularam 0,1 mL de solução de BHI *overnight* em 5 pintos de dois dias de idade por via subcutânea. Após 24 horas de observação, apenas uma ave morreu. Os órgãos da ave morta foram coletados, macerados e, em seguida, inoculados em caldo BHI *overnight*. Esta solução foi novamente inoculada em 5 pintinhos de 3 dias

de idade, dos quais 4 morreram. Os órgãos destes animais sofreram o mesmo procedimento de coleta, maceração e inoculação em BHI *overnight* e uma terceira passagem foi realizada em 10 pintos de 4 dias de idade, sendo que nenhum animal sobreviveu. Assim os autores perceberam que a cada passagem da bactéria em um hospedeiro, a cepa apresentou maior patogenicidade.

A inoculação experimental por via oral de 1,0 mL de soluções contendo  $6,25 \times 10^6$  UFC/mL de *P. multocida* em aves de 52 semanas de idade foi realizada por Rahman et al. (2004). Durante a necropsia destes animais, os autores observaram a ocorrência de lesões nodulares na superfície do fígado e hemorragias intestinais.

Souza (2010) utilizou 290 amostras de *Escherichia coli* isoladas de diversas fontes avícolas para a realização de um teste de patogenicidade em pintos de corte de um dia. Após um prévio cultivo das amostras em caldo BHI *overnight*, 0,1 mL das soluções bacterianas foram inoculadas por via subcutânea, cada qual em 10 pintos, e estes foram observados por 7 dias. Foram avaliados os seguintes critérios: lesões macroscópicas e o tempo de morte das aves, atribuindo-se valores numéricos de acordo com a ocorrência. Posteriormente, a análise destes valores permitiu a elaboração de uma equação matemática para a determinação de escores de patogenicidade em *E. coli*, que foram classificados em grupos de patogenicidade: alta, intermediária e baixa patogenicidade e também em apatogênicas.

### **3 MATERIAIS E MÉTODO**

#### **3.1 - Comitê de Ética no Uso de Animais**

Para a realização deste estudo, procedeu-se o envio e aprovação do projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), sob o Protocolo de número 22/2012, conforme Apêndice A.

#### **3.2 – Local de estudo**

O preparo das cepas a serem inoculadas, assim como a infecção experimental e avaliação das lesões macroscópicas encontradas durante a necropsia das aves foram realizados no Laboratório de Saúde das Aves e no setor de biotério experimental do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), localizado no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul. O reisolamento das amostras foi realizado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### **3.3 – Aquisição e manutenção das aves**

As aves utilizadas no trabalho foram adquiridas de uma empresa avícola fornecedora de pintos de corte localizada na região serrana do estado do Rio Grande do Sul. Estas aves eram provenientes de matrizes não vacinadas contra CA, e apresentavam mais de 60 semanas de idade média.

Os pintos de um dia foram alojados em salas de isolamento, dentro de caixas plásticas de contenção, em grupos constituídos por 10 aves, conforme é exemplificado na Figura 1.

Durante todo o período de alojamento as aves receberam ração e água *ad libitum*. A temperatura e umidade do ambiente foram monitoradas e controladas de acordo com a zona de conforto térmico preconizada. Foram coletadas amostras de ração de todos os módulos experimentais para verificação da presença e da concentração de micotoxinas nas mesmas. Nestes testes constatou-se uma concentração média de pouco mais 8 ppb (partes por bilhão) de aflatoxina nas amostras analisadas (APÊNDICE B).

Figura 1. Alojamento das aves em caixas de contenção e dispersão das caixas na sala de isolamento.



A) Dispersão das aves nas caixas de contenção. B) Disposição das caixas na sala de isolamento.

### 3.4 - Amostras

Para a realização deste estudo, foram selecionadas 97 amostras de *Pasteurella multocida*, inoculadas em quatro módulos ou baterias experimentais. Dentre estas amostras 56 cepas foram obtidas de casos clínicos de CA e 39 foram isoladas de suínos e de javalis, 01 cepa foi isolada de camundongos e 01 foi originária de búfalos. As amostras de camundongos e de búfalos foram enquadradas durante o estudo em conjunto com amostras de suínos.

Todas as amostras encontravam-se estocadas em sangue puro ovino à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  no CDPA.

Para a reativação destas amostras, utilizou-se o caldo de cultura não seletivo BHI. Uma alíquota de  $20\mu\text{L}$  da solução estoque de *P. multocida* foi transferida para 5 mL de caldo BHI e os tubos mantidos em estufa bacteriológica à  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram estriadas em dois meios distintos: ágar sangue adicionado de 5% de sangue ovino e ágar MacConkey. O primeiro representa uma excelente fonte de nutrientes para as bactérias do gênero *Pasteurella sp.*, enquanto o crescimento da maioria das *Pasteurella sp.* é inibido pelo segundo.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica nas mesmas condições citadas anteriormente. Após este período procedeu-se a identificação das características morfológicas das colônias e a realização de provas bioquímicas de catalase e de oxidase.

Também realizou-se a coloração por Giemsa a fim de se observar a bipolaridade típica da célula bacteriana. Colônias representativas de cada amostra foram selecionadas neste momento para a realização de um protocolo de PCR espécie específico para a identificação do gene *kmt*, conforme descrito por Bringhenti (2011).

### **3.5 - Dose Letal 50%**

Para a definição do volume de inóculo e do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) a ser utilizado em cada infecção experimental, foi realizado um projeto piloto para estabelecer a Dose Letal para 50% das aves ( $DL_{50}$ ). A partir de um inóculo de *P. multocida* incubado em BHI *overnight*, contendo  $10^8$  UFC/mL foi realizada a diluição seriada até  $10^{-9}$ . Grupos de 10 aves foram inoculados com cada amostra e com diferentes volumes: 0,1 mL, 0,3mL e 0,5mL através da via intraperitoneal. Cerca de 500 aves foram utilizadas para a determinação da  $DL_{50}$ . Seguindo a equação numérica e cálculos de Reed e Muench (1938), chegamos a uma  $DL_{50}$  aproximada de  $1 \times 10^5$  UFC.

### **3.6 - Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo foi padronizado para todas as amostras, conforme a técnica adaptada de Borsoi (2009).

Foi realizada a suspensão em 5 mL de BHI de uma colônia de *P. multocida*, proveniente de um cultivo *overnight* em ágar sangue. Após a suspensão as soluções foram homogeneizadas e em seguida sofreu diluições seriadas em solução salina 0,85% estéril. Uma alíquota de 20  $\mu$ L de cada diluição foi pipetada em quintuplicata em placas de AS. Utilizou-se contagem em placa através da técnica da gota (SANT'ANNA e CERQUEIRA, 2007), conforme a Figura 2.



Figura 2. Técnica de contagem de UFCs através da técnica da gota.



De acordo com a técnica o número de colônias obtidos na quintuplicata foi ajustado multiplicando-se o número de colônias obtido nas 5 gotas por 50 (fator de correção de 20  $\mu\text{L}$  para 1 mL) e dividindo por 5 (número de gotas). Após este cálculo foi estabelecida a relação da diluição que estava sendo contada e assim foi obtida a média em UFC/mL de cada amostra. O número de células presentes na suspensão inicial foi de  $10^7$  UFC/mL, a partir da qual conseguimos realizar uma técnica padrão de suspensão e de diluição das amostras para a inoculação.

O preparo dos inóculos foi realizado a partir dos seguintes passos: uma colônia de cada amostra obtida de um cultivo *overnight* em ágar sangue ovino (5%) foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de BHI estéril. Após homogeneização 1 mL desta solução foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,85% estéril. Assim o número de UFC/mL inicial passou de  $10^7$  para  $10^6$ . A solução obtida com  $10^6$  UFC/mL foi utilizada para a inoculação das amostras de *P. multocida*.

Para chegar ao número de células estabelecida na  $DL_{50}$  uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi retirada das soluções contendo  $10^6$  UFC/mL, chegando-se ao número aproximado de  $10^5$  UFC desejado para a realização do experimento.

### 3.7 - Inoculação

Foram realizadas 4 baterias experimentais, em cada uma delas foram inoculadas de 20 a 23 amostras, e todas estas baterias foram acompanhadas de um grupo controle.

Cada cepa foi inoculada em um grupo formado por 10 pintos com 1 dia de idade, totalizando 970 aves testadas, e somadas a mais 40 aves utilizadas como controle negativo. As amostras foram inoculadas com 0,1 mL da solução preparada através da via intraperitoneal, conforme demonstrado na Figura 3. Da mesma maneira que os grupos testados, os grupos controle continham 10 pintos com 01 dia de idade que foram inoculados com 0,1 mL de solução salina 0,85% estéril pela mesma via de inoculação dos grupos desafiados.

Após a inoculação das aves, eram realizadas 06 visitas por dia às salas de isolamento e os animais mortos eram recolhidos.

Figura 3. Processo de inoculação por via intraperitoneal dos pintos de um dia.

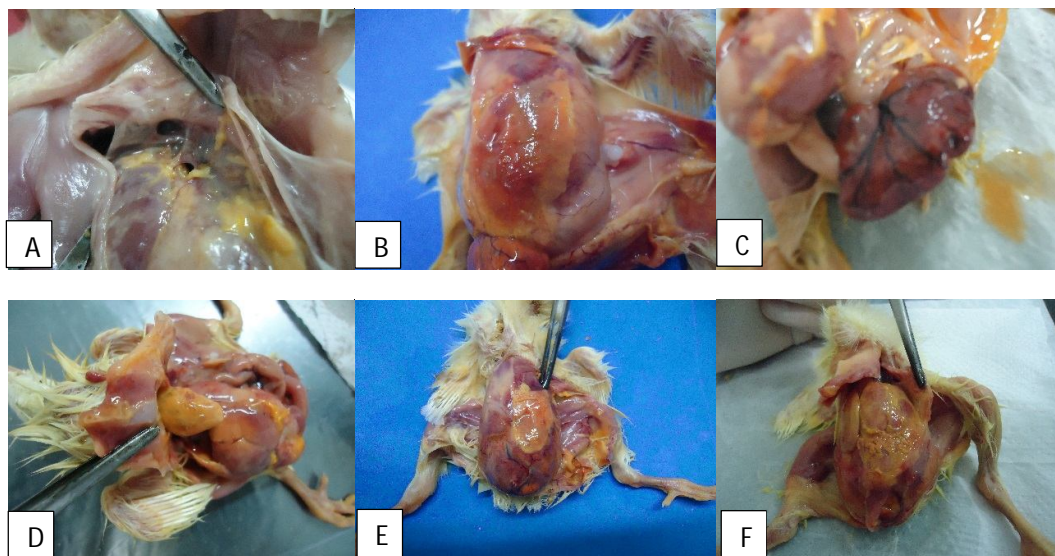


### **3.8 – Mortalidade, avaliação de lesões macroscópicas e reisolamento bacteriano**

O protocolo utilizado para a avaliação das lesões macroscópicas visualizadas durante a necropsia seguiram o modelo descrito por Souza (2010). As lesões avaliadas, foram: onfalite, celulite, aerossaculite, pericardite, perihepatite e peritonite.

As lesões analisadas na necropsia das aves do atual experimento encontram-se exemplificadas na Figura 4.

Figura 4. Lesões macroscópicas presentes nas observações das aves necropsiadas.



A – aerossaculite; B- celulite; C- onfalite; D- pericardite; E- perihepatite; F- peritonite. Todas as imagens foram geradas durante a necropsia dos animais utilizados neste estudo.

Os animais mortos de cada grupo foram necropsiados, e avaliados quanto à presença das lesões acima descritas e demonstradas.

Para a tentativa de reisolamento bacteriano, o fígado e o coração foram coletados assepticamente e inoculados em 5 mL de BHI. O diagnóstico bacteriológico seguiu os mesmos passos descritos para a reativação das amostras de *P. multocida* estocadas em sangue total.

Após 24 horas de incubação a 37°C, as soluções foram homogêneas e estriadas em Ágar Sangue Ovídeo (5%) e Ágar MacConkey, e novamente incubadas a 37°C por 24 horas (AMIGOT et al, 1998 apud CHRISTENSEN e BISGAARD, 2006). As colônias obtidas no AS foram observadas quanto às características morfológicas e foram realizadas provas bioquímicas de catalase e de oxidase. Colônias representativas de cada amostra foram selecionadas neste momento para a realização de um protocolo de PCR espécie específico para a identificação do gene *kmt*, conforme descrito por Brighenti (2011).

As aves remanescentes ao final de sete dias, foram submetidas à coleta de 2 mL de sangue, através de punção cardíaca para a realização do teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – IDEXX PM, lote LH628, conforme apêndice C) e eutanasiadas por deslocamento cervical. Também foram submetidas à necropsia e às

mesmas avaliações quanto à presença de lesões e às coletas de órgão para o reisolamento bacteriano.

### **3.9 - Cálculo do Índice de Patogenicidade**

O cálculo do Índice de Patogenicidade foi baseado no trabalho descrito por Souza (2010). Para a sua determinação, o critério de Tempo de Morte (TM) foi utilizado conjuntamente com a avaliação das lesões macroscópicas. Cada um destes dois critérios receberam pontuações iguais, equivalendo ao escores de 5 pontos cada.

Aves que morreram no primeiro dia pós-inoculação receberam escore máxima (1) para o TM avaliado. Do segundo ao sétimo dia, foi feita a diminuição proporcional do valor atribuído, calculando-se um Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) da seguinte maneira: o fator máximo de TM 1, foi dividido pelos 7 dias em que as aves foram avaliadas, obtendo-se o valor de 0,1428. Para cada dia em que as aves sobreviveram diminuiu-se 0,1428 do fator máximo estabelecido (1). Os valores obtidos para os TM foram multiplicados pelo valor 5 correspondente ao escore de pontos.

As aves sobreviventes, que foram eutanasiadas no sétimo dia pós-inoculação, receberam o valor zero (0) para o critério tempo de morte.

Os cinco pontos atribuídos às lesões foram divididos pelo número de lesões avaliadas. A divisão do escore máximo de lesões (5) pelo número de lesões avaliadas (6), resultou no valor atribuído para cada lesão, 0,833.

Aves que morreram no primeiro dia pi, receberam os escores máximos para os dois critérios avaliados, resultado no Índice de Patogenicidade Individual (IPI) máximo (10).

Os FBS e os possíveis escores de lesões estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre o tempo de morte e valor atribuído ao FBS e relação entre o número de lesões e o respectivo valor atribuído.

Fator de Bonificação de Sobrevivência			Somatório do Escore de Lesões	
Dia de Morte	TM	FBS	Nº de Lesões	Valor
1	1	5	6	5,000
2	0,8572	4,285714	5	4,167
3	0,7144	3,571429	4	3,333
4	0,571	2,857143	3	2,500
5	0,4284	2,142857	2	1,667
6	0,2857	1,428571	1	0,833
7	0,1428	0,714286	0	0,000
7*	0	0		

7\* = aves que sobreviveram até o sétimo dia e foram eutanasiadas.

Assim, o Índice de Patogenicidade Individual calculado foi gerado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IPI} = \text{TM} \times 5 + (\text{PC} + \text{PH} + \text{PT} + \text{ASS} + \text{CL} + \text{ONF}) \times 0,833$$

Onde:

IPI = Índice de Patogenicidade individual

TM = Tempo de Morte – para as aves que permaneceram vivas e precisaram ser eutanasiadas (7\*), o valor de TM foi determinado como 0 para que o cálculo de FBS resultasse em 0.

PC = Pericardite

PH = Perihepatite

PT = Peritonite

ASS = Aerossaculite

CL = Celulite

ONF = Onfalite

0,833 = fator de multiplicação das lesões (5 pontos para lesões divididos pelas 6 lesões avaliadas)

Para calcular o Índice de Patogenicidade (IP) de cada amostra inoculada no grupo formado por 10 pintinhos, os valores obtidos através do cálculo do IPI, foram somados e a média aritmética foi gerada, de acordo com a equação abaixo:

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

N

Onde:

IP = Índice de Patogenicidade da Amostra

$\sum$  IPI = Somatório dos Índices de Patogenicidade Individual

N = Número de pintos inoculados

Tabela 2. Representação da execução do cálculo do Índice de Patogenicidade por amostra bacteriana.

Amostra	Animal	DM	TM	FBS	CL	PC	PH	PT	ASS	ONF	Lesões	IPI
33	1	2	0,857	4,286	0	1	1	1	1	1	4,167	8,45
33	2	2	0,857	4,286	1	0	0	0	1	1	2,500	6,79
33	3	2	0,857	4,286	0	0	0	1	1	1	2,500	6,79
33	4	2	0,857	4,286	0	0	0	1	1	1	2,500	6,79
33	5	3	0,714	3,571	0	0	0	1	1	1	2,500	6,07
33	6	7*	0	-	0	0	1	1	1	1	3,333	3,33
33	7	7*	0	-	0	0	0	1	1	1	2,500	2,50
33	8	7*	0	-	0	0	1	1	1	1	3,333	3,33
33	9	7*	0	-	0	0	0	1	1	1	2,500	2,50
33	10	7*	0	-	1	0	1	1	1	1	4,167	4,17
<b>IP Amostra</b>									<b>5,07</b>			

- = Não há FBS

1 = Ocorrência de lesão

0 = Ausência de lesão

7\* = Eutanasiadas no sétimo dia pós inoculação

IP = soma do FBS e dos valores das lesões

IP Amostra = média dos valores de IP

### **3.10. – Análise estatística**

Os dados obtidos no presente estudo foram analisados pelo programa computacional GraphPad Prism® 6.

Para a verificação da normalidade dos dados, foram utilizados os testes de D'Agostinho & Pearson e Shapiro-Wilk.

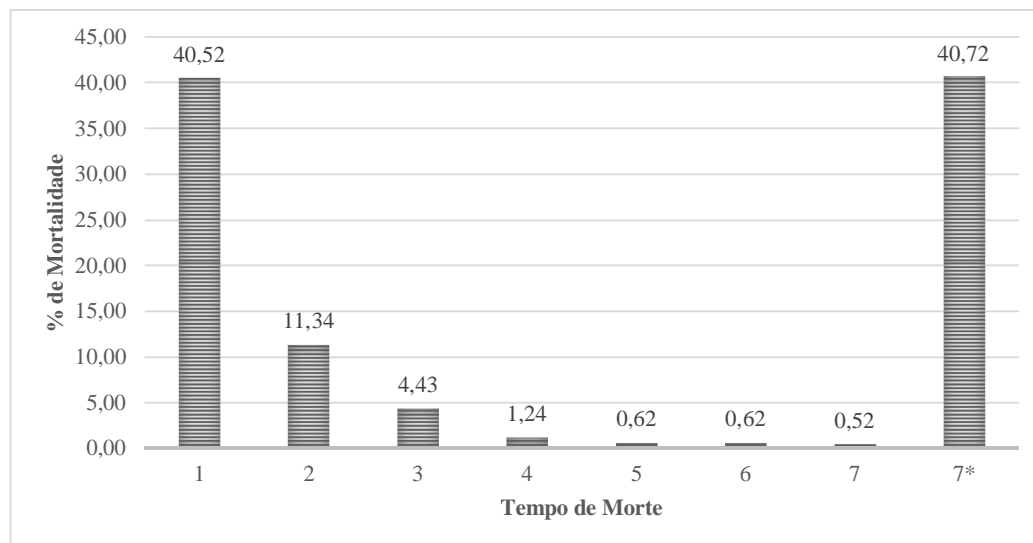
Em função da característica dos dados não seguirem uma distribuição normal, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann Whitney para a avaliação dos mesmos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Relação da mortalidade com o tempo de morte avaliado

Os resultados obtidos no estudo demonstram uma mortalidade de aproximadamente 52% das aves nos 2 primeiros dias pós-inoculação (pi). Os dias intermediários (3,4,5,6 dias pi) apresentaram uma reduzida taxa de mortalidade. Ao final do período de 07 dias de avaliação, um total de 59,28% das aves morreram e 40,72% das aves foram eutanasiadas, conforme demonstra o Gráfico 1.

Gráfico 1. Relação percentual entre a mortalidade e o tempo de morte das aves inoculadas no período de 07 dias de avaliação.



Tempo de Morte = dias de avaliação pós-inoculação

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

A distribuição da mortalidade de acordo com o tempo de morte teve maior expressividade nos dois primeiros dias pós inoculação, sendo estes responsáveis por aproximadamente 52% da mortalidade total (Gráfico 1).

A Tabela 3 que encontra-se a seguir demonstra a distribuição dos percentuais de mortalidades dos animais testados para as diferentes origens das amostras. Onde é possível observar que houve diferença estatística entre as mortalidades diárias para as diferentes espécies, nos dias 1, 2 e 4. Houveram diferenças estatísticas também no



percentual de aves sobreviventes para as diferentes espécies de origem das cepas de *P. multocida*.

Tabela 3. Distribuição percentual das mortalidades diárias para as diferentes origens das amostras.

Origem	Mortalidade diária								Total
	1	2	3	4	5	6	7	7*	
<b>Aves</b>	56,1 <sup>a</sup>	13,6 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	1,6 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	24,3 <sup>a</sup>	560
<b>Suínos</b>	19,3 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>	6,3 <sup>a</sup>	0,7 <sup>b</sup>	0,7 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>	63,2 <sup>b</sup>	410

Teste de múltiplas comparações de Dunn's.  $P > 0,0001$  e alfa de 0,05. Onde letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos analisados.

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

Os resultados do Gráfico 1 e da Tabela 3 estão de acordo com os dados de mortalidade observados no estabelecimento da  $DL_{50}$  para o atual estudo, conforme os dados descritos na metodologia.

Hazarika (2011) determinou a  $DL_{50}$  para amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos de suínos, através da inoculação experimental de camundongos e confirmou em seu estudo que  $10^5$  UFC/mL é a concentração ótima para causar 50% de mortalidade em camundongos. Manoharan et al. (1997 apud HAZARIKA, 2011) também determinou a mesma concentração em seu trabalho com camundongos.

O Tempo de Morte observado também apresenta resultado similar ao trabalho realizado por Wilkie, et al., (2000), em que aves com 12 semanas de idade foram inoculadas pela via intramuscular com duas cepas de *P. multocida* com diferentes graus de patogenicidade. As aves inoculadas com a cepa sabidamente de alta patogenicidade morreram em um período médio de 22 a 23 horas após a inoculação, enquanto as aves inoculadas com uma cepa sabidamente de baixa patogenicidade morreram em até 72 horas após a inoculação.

## 4.2 - Presença de lesões e reisolamento bacteriano

A mediana das lesões observadas e os respectivos desvios padrão (DP) resultantes das observações realizadas nas aves são apresentados na Tabela 4. Percebe-se que em todas as situações as cepas de origem suína apresentaram menor número de lesões do que as amostras de origem aviária, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa.

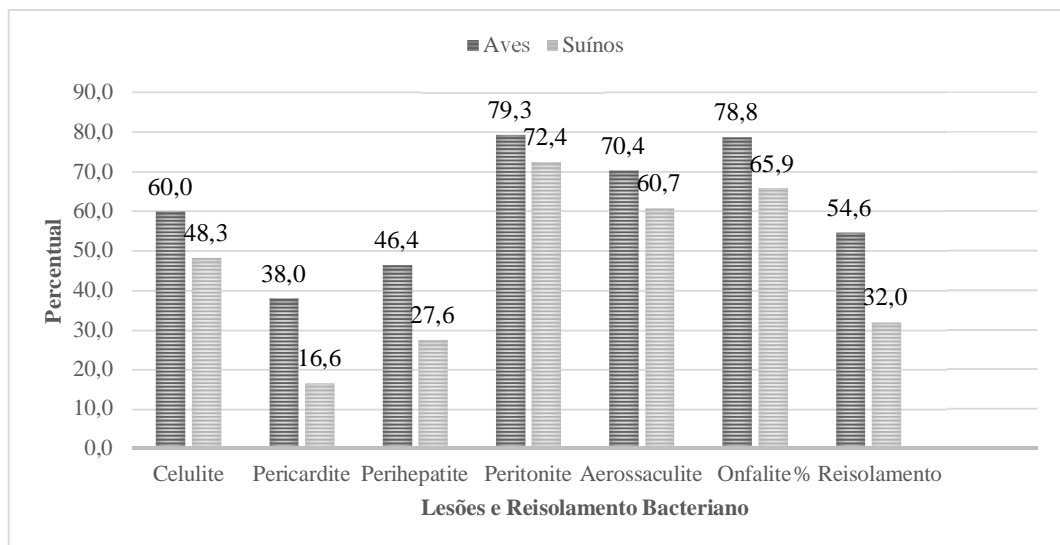
Tabela 4. Medianas das lesões nos grupos de 10 aves inoculadas de acordo com a origem das amostras.

Origem	N°	Medianas das Lesões ± DP					
		CL	PC	PH	PT	ASS	ONF
Aves	56	6,5 ± 2,54 <sup>a</sup>	3,0 ± 2,62 <sup>a</sup>	4,5 ± 2,33 <sup>a</sup>	9,0 ± 2,87 <sup>a</sup>	7,0 ± 2,30 <sup>a</sup>	9,0 ± 2,18 <sup>a</sup>
Suínos	41	6,0 ± 3,14 <sup>a</sup>	1,0 ± 1,53 <sup>a</sup>	2,0 ± 2,14 <sup>a</sup>	8,0 ± 2,32 <sup>a</sup>	6,0 ± 2,35 <sup>a</sup>	7,0 ± 2,61 <sup>a</sup>

Teste de múltiplas comparações de Dunn's. P>0,0001 e alfa de 0,05.

O Gráfico 2 que é demonstrado a seguir, apresenta as frequências obtidas para cada lesão e para o percentual de reisolamento, de acordo com a origem das cepas. As lesões demonstradas no Gráfico 2 abaixo e na Tabela 4 apresentada anteriormente são descritas como lesões septicêmicas comuns às encontradas em infecções bacterianas, assim como a *P. multocida*.

Gráfico 2. Frequência de lesões observadas por cepas de aves e suínos e o percentual de reisolamento bacteriano obtido para cada uma das origens.



Nunes et al. (2008) observaram a presença de pneumonia e de aerossaculite em aves de criação colonial e diagnosticaram a presença do agente *P. multocida* através de reisolamento bacteriano convencional. De acordo com Christensen e Bisgaard (2000), as lesões pleuro-pneumônicas fibrinosas são claramente visíveis nas áreas afetadas, podendo serem uni ou bilaterais e com grandes extensões de exsudação de fibrina. Derakhshanfar e Ghanbarpour (2002) descrevem que além da *E. coli*, outras bactérias como *P. multocida* também são frequentemente isoladas de lesões de celulite em aves. Rahman et al. (2004) encontraram lesões indicativas de septicemia em diferentes órgãos, além de oviposição intrabdominal em alguns casos ao necropsiar aves com 52 semanas de idade inoculadas experimentalmente com a bactéria.

Ao descrever dois casos de CA na Austrália, Zhang et al. (2003) observaram ao exame *post mortem* que as aves apresentavam necrose do fígado, peritonite fibrinosa, pericardite, perihepatite, pneumonia e formação de abscessos. Shivaprasad et al. (2012) também descreve as lesões comumente encontradas em casos de CA: petéquias nas vísceras, fígado edemaciado com focos necróticos, pericardite, aerossaculite, celulite, endocardite, peritonite, ooforite (reprodutoras), além de sinusite, osteomielite, sinovites e conjuntivites em casos crônicos.

As lesões macroscópicas causadas por *E. coli* e outras bactérias são muito similares, independente do micro-organismo envolvido. Somente através do diagnóstico bacteriológico é possível correlacionar os achados macroscópicos ao agente etiológico. (FISHER et al., 1998 apud BORGES, 2006; BISGAARD e DAM, 2001 apud BORGES, 2006).

Em alguns casos crônicos, lesões supurativas podem estar amplamente distribuídas, envolvendo o trato respiratório, a conjuntiva e tecidos adjacentes à região da cabeça. Artrite caseosa e inflamação produtiva da cavidade peritoneal também são achados comuns. Lesões de dermatite fibrino-necrótica na região dorsal ou ventral do corpo da ave também têm sido observadas em perus e em frangos (CRISTENSEN, 2013).

Os percentuais de reisolamento, de acordo com suas medianas e com o desvio padrão, estão descritos na Tabela 5. Obteve-se um maior sucesso no reisolamento das cepas de origem aviária.

Tabela 5. Medianas dos percentuais de reisolamento bacteriano decorrentes das diferentes origens das amostras.

Origem	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Aves	56	60 ± 25,22 <sup>a</sup>
Suínos	41	30 ± 19,90 <sup>b</sup>

Kruskal-Wallis de medianas, com  $P > 0,0001$ . Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas significativas.

A Tabela 6 demonstra que existe diferença entre o reisolamento realizado nas aves que morreram nos dois primeiros dias quando comparado com as aves eutanasiadas. Já o reisolamento bacteriano obtido entre os dias 3 e 7 pi são menos expressivos e não houve diferença estatística entre o percentual de reisolamento obtido nestes dias, quando comparados aos reisolamentos obtidos para as aves que morreram nos dias 1 e 2 pi, e também às aves eutanasiadas.

Tabela 6. Percentual de reisolamento bacteriano versus o dia de reisolamento.

Dias	Mortalidade	Reisolamento	% Reisolamento
Dia 1	393	253	64,38 <sup>a</sup>
Dia 2	110	74	67,27 <sup>a</sup>
Dia 3	43	17	39,53 <sup>a b</sup>
Dia 4	12	3	25,00 <sup>a b</sup>
Dia 5	6	3	50,00 <sup>a b</sup>
Dia 6	6	2	33,33 <sup>a b</sup>
Dia 7	5	2	40,00 <sup>a b</sup>
Dia 7*	395	94	23,80 <sup>b</sup>

Teste Pearson de comparação de percentuais. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos analisados.

Durante a realização de um teste de patogenicidade em camundongos, Mohamed (2012), conseguiu recuperar *P. multocida* do fígado, do baço e do sangue cardíaco. Balakrishnan e Roy (2012) também obtiveram sucesso em recuperar 8 cepas de *Pasteurella multocida* de origem avícola, após o cultivo bacteriano do sangue cardíaco coletado de camundongos previamente inoculados.

Porém, é sabido que a maioria dos testes de patogenicidade não envolve o posterior reisolamento bacteriano. Grande parte das tentativas de se mensurar a patogenicidade de *Pasteurella multocida* envolve apenas a confirmação do diagnóstico

por visualização microscópica da célula bacteriana, cujas características morfológicas são bastante utilizadas para este fim.

As diferenças de mortalidade e da frequência de lesões quando correlacionadas às espécies de origem poderiam explicar o menor percentual de reisolamento bacteriano obtido para amostras de suínos, em comparação com as amostras oriundas de aves. Outro fator que pode estar correlacionado refere-se a especificidade das amostras com relação à sua origem, ou seja, as amostras oriundas de aves são capazes de causar mais lesões em aves do que as demais amostras.

### 4.3 – Índices de Patogenicidade

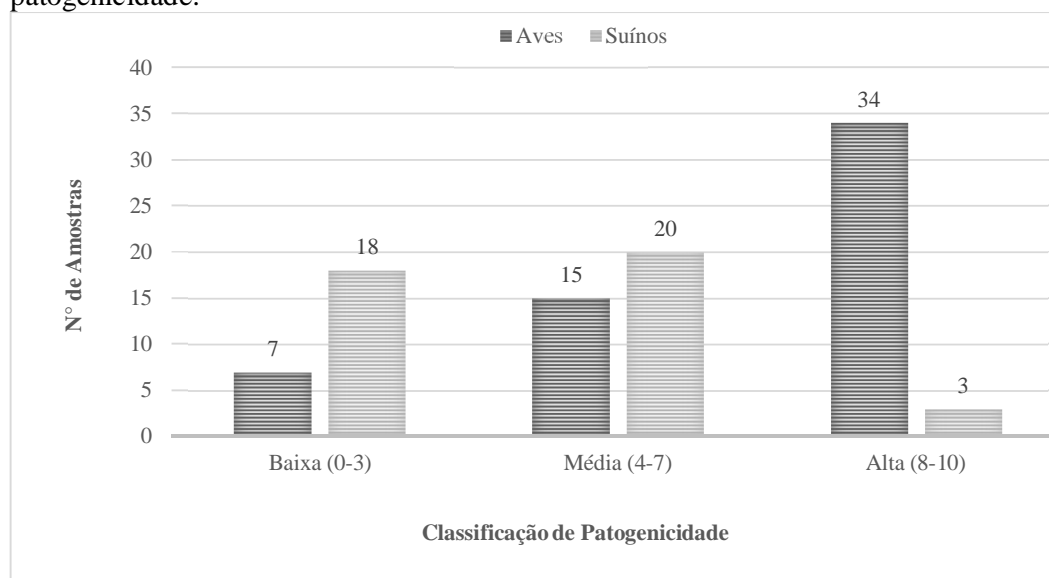
As 97 cepas de *P. multocida* foram classificadas conforme os Índices de Patogenicidade (IP) obtidos em três diferentes grupos. A análise das medianas dos índices de acordo com a origem dos isolados apresenta diferença estatística, conforme demonstram os dados da Tabela 7. No Gráfico 3, as cepas de diferentes origens estão distribuídas nos três grupos de classificação do IP: Alta (IP de 8 a 10), Média (IP de 4 a 7) e Baixa (IP de 0 a 3). A distribuição da classificação das cepas nos grupos de patogenicidade encontra-se descrita no Gráfico 3.

Tabela 7. Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a origem das amostras.

Origem	Nº de Amostras	Mediana ± DP
Aves	56	7,86 ± 2,67 <sup>a</sup>
Suínos	41	3,79 ± 2,57 <sup>b</sup>

Kruskal-Wallis de comparação de medianas. P<0,001. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos analisados.

Gráfico 3. Distribuição das amostras de acordo com a origem nos grupos de patogenicidade.



A Tabela 8 apresenta a distribuição em conjunto das 97 amostras de *P. multocida* nos três diferentes grupos conforme o IP obtido. Os resultados demonstram que houve diferença significativa nos valores da mediana do IP entre os grupos de patogenicidade.

Tabela 8. Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das amostras de origem aviária e suína nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana $\pm$ DP
Alta	37	9,13 $\pm$ 0,953 <sup>a</sup>
Média	35	5,24 $\pm$ 1,159 <sup>b</sup>
Baixa	25	1,75 $\pm$ 0,837 <sup>c</sup>

Kruskal-Wallis de medianas, com  $P > 0,0001$ . Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa.

A Tabela 9 representa as 56 amostras de *Pasteurella multocida* de origem avícola distribuídas por classificação de patogenicidade, conforme o IP obtido. Do total destas amostras, 34 foram classificadas como alta patogenicidade, 15 como média e 7 como amostras de baixa patogenicidade.

Não houve diferença estatística entre as amostras de baixa e média patogenicidade. Porém estes dois grupos diferiram estatisticamente do grupo de alta patogenicidade.

Tabela 9. Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das amostras de origem aviária nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana $\pm$ DP
Alta	34	9,03 $\pm$ 0,957 <sup>b</sup>
Média	15	5,07 $\pm$ 1,035 <sup>a</sup>
Baixa	7	2,29 $\pm$ 1,146 <sup>a</sup>

Kruskal-Wallis de medianas, com  $P > 0,0001$ . Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa.

A Tabela 10 representa a classificação de patogenicidades das 41 amostras de origem suína, onde 3 amostras foram classificadas sendo de alta patogenicidade, 20 de média e 18 de baixa patogenicidade. Os estudos estatísticos revelaram que existe diferença estatística entre as amostras de baixa e média patogenicidade, bem como entre as amostras de baixa e alta patogenicidade, porém não houve diferença significativa entre as amostras de média e alta patogenicidade, essa diferença pode ser justificada pelo pequeno número de amostras classificadas como de alta patogenicidade.

Tabela 10. Mediana dos valores dos Índices de Patogenicidade (IP) de acordo com a distribuição das amostras de origem suína nos grupos de patogenicidade.

Classificação de Patogenicidade	Nº de Amostras	Mediana $\pm$ DP
Alta	3	10 $\pm$ 0,999 <sup>b</sup>
Média	20	5,35 $\pm$ 1,267 <sup>b</sup>
Baixa	18	1,623 $\pm$ 0,675 <sup>a</sup>

Kruskal-Wallis de medianas, com  $P > 0,0001$ . Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, observa-se que existe uma maior frequência de amostras provenientes de aves com índices de patogenicidade altos, enquanto a maior frequência de patogenicidade para as amostras de suínos ficou dividida entre os IPs de média e de baixa patogenicidade.

Hazarika (2011), descreve em seus estudos de patogenicidade com camundongos, que as amostras provenientes de suínos com as quais ele trabalhou, não foram igualmente patogênicas. Gy et al. (2008), avaliaram a patogenicidade de 12 amostras de *P. multocida* isoladas de casos clínicos em coelhos através da inoculação por via intraperitoneal em camundongos. Os isolados foram classificados em cepas patogênicas, apatogênicas e levemente patogênicas, de acordo com a mortalidade e os sinais clínicos que os animais apresentaram durante 7 dias.

A inexistência de estudos disponíveis na literatura sobre patogenicidades em *P. multocida* em que as cepas são classificadas de maneira objetiva e clara dificultam a comparação dos dados obtidos no atual estudo.

O índice obtido neste estudo poderá servir como fonte de dados para suprir projetos que se aprofundam ainda mais na caracterização da patogenicidade das amostras de *P. multocida* e estes próximos passos poderão gerar modelos ainda mais ajustados de avaliação de patogenicidade.

A listagem com a distribuição de todas as amostras analisadas e seus respectivos IP encontra-se no APÊNDICE D.

#### **4.4 – Resultados sorológicos**

Nenhuma das cepas avaliadas foi reativa ao teste ELISA, ou seja, 7 dias pós inoculação as aves não apresentaram resposta imune mensurável através do teste realizado.

Chaudhuri et al. (2012) avaliou a resposta imune humoral de camundongos e coelhos inoculados experimentalmente com uma cepa de *P. multocida*. Ambos os animais apresentaram título de anticorpos, contudo o teste foi realizado 10 dias após a primeira inoculação.

Wilkie et al. (2000) inocularam aves com 5 diferentes cepas de *P. multocida* em dois desafios em intervalos de 28 dias por 4 diferentes rotas (intratraqueal, conjuntival, intravenosa e intravenosa). Os soros das aves foram coletados 2 dias após cada inoculação. Os testes de ELISA das amostras coletadas após a primeira inoculação



realizada nas aves com 07 dias de idade apresentaram baixos títulos. Por outro lado, as amostras coletadas 30 dias após a primeira infecção e 2 dias após a segunda inoculação resultaram em altos títulos, principalmente para as aves que na primeira inoculação foram desafiadas através das vias intravenosa e intramuscular.

Os resultados sorológicos negativos obtidos no experimento demonstram que provavelmente as aves não tiveram tempo suficiente durante o período de observação para que os anticorpos fossem produzidos.

## 5 CONCLUSÕES

É possível identificar diferenças estatísticas entre os resultados dos índices de patogenicidade podendo separá-los em diferentes classificações ou grupos.

Cepas provenientes de aves são estatisticamente mais patogênicas para pintos de um dia do que as cepas isoladas de suínos.

Os dados utilizados para a execução do estudo, fator de bonificação de sobrevivência, e as lesões macroscópicas, refletiram bem a patogenicidade das amostras, após a inoculação dos pintinhos.

O presente estudo nos proporcionou uma metodologia diferenciada de análise da patogenicidade das cepas de *Pasteurella multocida*, podendo mensurar de forma mais consistente a patogenicidade destas amostras, diferentemente dos modelos animais propostos anteriormente.

## REFERÊNCIAS

- AMONSIN, A.; WELLEHAN, J. F. X.; LI, L. L.; LABER, J. e KAPUR, V. DNA finger printing of *Pasteurella multocida* recovered from Avian Sources. Journal of Clinical Microbiology. 2002. P. 3025-3031.
- BACK, A. Manual de Doenças das Aves. Coluna do Saber. 2004. p.25-28.
- BALAKRISHAN, G. e ROY, P. Isolation, identification and antibiograma of *Pasteurella multocida* isolates of avian origin. Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences. 2012. v. 8. p. 199-202.
- BIBERSTEIN, E. L. e HIRSH, D. C. *Pasteurella*. In: HIRSH, D. C. Microbiologia Veterinária. Guanabara Koogan. 2003. p. 127-132.
- BLANCHONG, J. A.; SAMUEL, M. D.; MACK, G. Multi-species patterns of avian cholera mortality in Nebraska's Rainwater Basin. Journal of Wild Diseases. 2006. v.42. p.81 – 91.
- BOERLIN, P. Evolution of Bacterial Virulence. In: GYLES, C. L. et al. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell Publishing. 2010. 1 ed. p. 33-50.
- BORGES, V. P. Principais lesões macro e microscópicas em frangos de corte condenados por caquexia em abatedouro: contribuição ao diagnóstico. Dissertação de Mestrado. UNESP. 2006. Dados não publicados.
- BORSOI, A.; SANTIN, E; SANTOS, L. R.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella Heidelberg* strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. Poultry Science. 2009. v. 88. p. 750–758.
- BOSCH, M.; GARRIDO, M. E.; LLAGOSTERA, M.; ROZAS, A. M.P.; BADIOLA, I.; BARBE, J. *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. FEMS Microbiol. Lett. 2002. v. 210. p. 201 – 208 .
- BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. Journal of Biotechnology. 2000. v.83. p. 153-160.

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

BOYCE, J.D.; HARPER, M.; WILKIE, I.W. e ADLER, B. *Pasteurella*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4 ed. Blackwell Publishing. 2010. p. 325-340.

BRINGHENTI, J. D. M. Protocolo de *Pasteurella multocida* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011. Dados não publicados.

CAMERON, R. D. A; O' BOYLE, D. O; FROST, A. J.; GORDON, A. N.; FEGAN, N. An outbreak of haemorrhagic septicaemia associated with *Pasteurella multocida* subsp. *gallicida* in a large pig herd. *Australian Veterinary Journal*. 1996. v.73. p. 27 – 29 .

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

CHAUDHURI, P.; SINGH, V. P.; THAMIZHARASAN, A.; LALSIAMTHARA, J. *Pasteurella multocida* P52 *aroA* mutant conferred protection to rabbits and mice against haemorrhagic septicaemia. *DHR International Journal Of Biomedical and Life Sciences*. V. 3(1). p. 2278-8301.

CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Ultrastructure of cell envelopes of bactéria of the bovine rumen. *Applicated Microbiology*. 1975. v. 29. p. 841-849.

CHOI-KIM, K.; MAHESWARAN, S. K.; FELICE, L. J; e MOLITOR, T.W. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Veteriary Microbiology*. 1991. v. 28 p. 75 – 92 .

CHUNG, J. Y.; WILKIE, I.; BOYCE, J. D.; TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; GHODDUSI, M.; ADLER, B. Role of Capsule in the pathogenesis fowl cólera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and Immunity*. 2001. v.4. p. 2487-2492.

CHRISTENSEN, J. P. Overview of Fowl Cholera.2013. Acessado em: 09/01/2014 às 15:56. [http://www.merckmanuals.com/vet/poultry/fowl\\_cholera/overview\\_of\\_fowl\\_cholera.html?qt=Fowl cholera&alt=sh#v3341348](http://www.merckmanuals.com/vet/poultry/fowl_cholera/overview_of_fowl_cholera.html?qt=Fowl cholera&alt=sh#v3341348)

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. The Genus *Pasteurella*. In: The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer-Verlag. 2006. v. 6 p. 1062-1090.

COLVERO, L. P. Micotoxicose em aves. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2008. p. 34.

DABO, S. M.; CONFER, A. W. e QUIJANO-BLAS, R. A. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotipe A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. Microbial Pathogenesis. 2003. v.35. p. 147-157.

DERAKHSHANFAR, A. E GHANBARPOUR, R. A study on avian cellulitis in broiler chickens. VETERINARSKI ARHIV. 2002. v. 72. p. 277-284.

DZIVA, F.; MUHAIRWA, A.P.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology, 2008. v.128. p. 01-22.

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

FERRI, E. R.; GUTIÉRREZ, C. B.; NAVAS, J.; DE LA PUENTE, L.; DEL RIO, M. I.; GARCIA DEL BLANCO, N.; MONTER, J. L.; GUTIÉRREZ, B.; BLANCO, M. Neumonía por *Pasteurella multocida*. Departamento de Sanidad Animal. Universidad de León. 2006.

FULLER, T. E.; KENNEDY, M. J.; E LOWERY, D. E. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model usingsignature - tagged Mutagenesis. Microbiology Pathogenic. 2000. v.29. p. 25 – 38 .

FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; ROCHA, S. L. S.; RODRIGUES, E. E.; NASCIMENTOS, V. P.; SALLE, C. T. P. e MORAES, H. L. S. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. 2013. Pesquisa Veterinária Brasileira. v.33. p.177-182.

GANDRA, E.A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W.S.; & GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Acta Scientific Technologies. 2008. v.30. p.109-118.

GLISSON, J.R.; SANDHU, T. S.; HAFACRE, C.L. Pasteurellosis, Avibacteriosis, Gallibacteriosis, Reimerellosis and Pseudotuberculosis. A Laboratory Manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, AAAP. 2008. 4 ed. Cp. 4. p. 12-15. (a)

GLISSON, J.R. Pasteurellosis and Other Respiratory Bacterial Infections. In: Diseases of Poultry. Blackwell Publishing. 2008. 12° ed. p.739-758. (b)

GY, V.; KULCSÁR, G. e MAKRANSZKI, L. Mice Pathogenicity of *Pasteurella multocida* Strains isolated from diseased and healthy rabbits. 9° World Rabbit Congress. Verona, Italy. Pathology and Higiene. 2008. p. 1119-1123.

GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F. Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms. In: GYLES, et al. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell Publishing. 2010. 4 ed. p. 3 – 14.

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

HAZARIKA, M. P.; BARMAN, N. N.; GERORGE, S. e SHARMA, R. K. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic pigs of Assam. Indian Journal of Animal Research. 2011. v. 44. p. 265-269.

HEDDLESTON, K. L.; WATKO, L.P.; REBERS, P. A. Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. Avian Diseases. 1963. v.8. p. 649-657.

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

HOERR, F. J. Mycotoxixoses. In: Diseases of Poultry. Blackwell Publishing. 2008. 12° ed. p.1197 – 1229.

HU, S. P.; FELICE, L. J.; SIVANANDAN, V.; e MAHESWARAN, S. K. Siderophore production by *Pasteurella multocida* . Infection´s Immunity. 1986. v.54 p. 804 – 810 .

HUBERMAN, Y. D.; CONDE, M; D; TERZOLO, H.R. *Pasteurella multocida*: effect of in vivo passages on pathogenicity in chicks. XXII Latin America Poultry Congress. 2011. p.1-4.

HUNT, M. L.; COX, A. J.; RUFFOLO, C. G.; RAJAKUMAR, K.; e ADLER, B. Characterisation of a *Pasteurella multocida* esterase gene which confers a hemolytic phenotype in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. FEMS Microbiology Letters. 2000. v.192. p. 249 – 256.

IBRAHIM, R. S.; SAWADA, T.; EL-BALLAL, S.; SHAHATA, M.; YOSHIDA, T. e KATAOKA, Y. *Pasteurella multocida* Infection in the Chicken Embryo. Journal of Comparative Pathology. 1998. v.118. p.291-300.

ISAACSON, R.E. e TRIGO, E. Pili of *Pasteurella multocida* of porcine origin. FEMS Microbiological Lett. 1995.v 132. p.247-251

KREWER, C. DA C.; MABONI, F.; WITT, N. M.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. P. C. DE. Transmissão de *Pasteurella multocida* para humano através de mordida de gato – Relato de caso. Veterinary Notes. 2008. v.14, n. 1, p.77-80.

KUBATZKY, K. F. *Pasteurella multocida* and Imunne Cells. Current Topics in Microbiology e Immunology. Springer Velag. 2012. p.1-20.

KUMAR, A.A.; HARBELA, P.C.; RIMLER, R.B. e KUMAR, P.N. Studies on *Pasteurella multocida* isolates of animal and avian origin from India. Indian Journal of Comparative Microbiology and Immunological Infectious Diseases. 1996. v.17. p.120-124.

KREWULAK, K. D.; e VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. Biochimical of Biophysics. Acta. 2008. v. 1778. p.1781 – 1804.

LEE, C.W.; WILKIE, I.W.; TOWNSEND, K.M.; FROST, A. J. The demonstration of *Pasteurella multocida* in the alimentary tract of chickens after experimental oral infection. Veterinary Microbiology. 2000. v.72. p. 47-55.

MONTGOMERY, R. D.; STEIN JR, G.; STOTTS, V. D.; SETTLE, F. H. The 1978 epornitic of avian cholera on the Chesapeake Bay . Avian. Diseases. 1979. v.23. p.966 – 978 .

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

MOHAMED, A. M.; MOHAMED, M-W. A.; AHMED, A. I.; IBRAHIM, A. A. e AHMED, M. S. *Pasteurella multocida* in bachyard chickens in Upper Egypt: incidence with PCR analysis for capsule type, virulence in chicken embryos ans antimicrobial resistence. Veterinaria Italiana. 2012. v. 48. p. 77-86.

MUTTERS, R.; MANHEIM, W.; BISGAARD, M. Taxonomy of the group. In: ADLAM, C.; RUTTER, J. M. *Pasteurella* and Pasteurellosis. Academic Press. 1989. p. 3-34.

MUTTERS, R.; CHRISTENSEN, H. and BISGAARD, M. Genus *Pasteurella* Trevisan. In: Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Springer Verlag. 2003. 2 ed. p. 1887-1894.

NAKAMINE, M.; OHSHIRO, M.; AMEKU, M.; OHSHIRO, K.; KERUMA, T.; SAWADA, T. e EZAKI, T. Outbreak of fowl cholera in muscovy ducks in Japan. Journal of Veterinary Medical Science. 1992. v.54. p.1225-1227.

NASCIMENTO, V. P.; GAMA, N. M. S. Q.; CANAL, C. W. Coriza infecciosa das galinhas, Pasteureloses e outras infecções bacterianas relacionadas. In: Berchieri Júnior, A. et al. Doenças das Aves. FACTA. 2009. 2 ed. p. 512-521.

NEVES, A. M. G. S. Microbiologia: uma história de séculos de inovação. Escola Superior Agrária de Santarém. 2008. p. 1-3. Acessado em 11/11/2013, às 17:33 hs. [http://www.esa.ipsantarem.pt/newsletter/N9SetembroOutubro2008/index\\_ficheiros/Microbiologia.pdf](http://www.esa.ipsantarem.pt/newsletter/N9SetembroOutubro2008/index_ficheiros/Microbiologia.pdf)

NUNES, C.F.; VILELA, C. DE O.; CAETANO, C.F.; MUNHOZ, L.; RAFFI, M. B.; FINGER, P. F.; SIEDLER, B.; FISHER, G.; FERREIRA, L.N.; VARGAS, G.D. Ascaridíase e Pasteurelose em aves de criação colonial. UFPel. Laboratório de Virologia e Imunologia e Laboratório Regional de Diagnósticos. 2008. p.1-3.

PATEL, H. K. Biochemical characterization, atimicrobial sensitivity, PCR-Based detection and mouse pathogenicity of *Pasteurella multocida* field isolates. (2004). Dissertação de Mestrado. Dados não publicados.



PAUSTIAN, M. L.; MAY, B. J.; CAO, D.; BOLEY, D.; e KAPUR, V. The transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. *Journal of Bacteriology*.2002. v.184 p. 6714 – 6720 .

RAHMAN, M. A.; SAMAD, M. A.; RAHMAN, M. B. e KABIR, M; L. acterio-pathological studies on Salmonellosis, Colibacillosis and Pasteurellosis in natural and experimental infections in Chickens. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicin*. 2004. v.2. p. 01-08.

RAJINI, R.; SESNAGIRI, R.A.; DHANALAKSHMI, K e SHARMA, B. J. R. Studies on avian pasteurellosis in Andhra Pradesh. *Indian Veterinary Journal*. 1995. v.72 p.115-118.

REBERS, P.A.; JENSEN, A.E. and LAIRD, G.A. Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases*. 1988. v.32. p. 313-318.

REED, L. J. e MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent endpoint. *The American Journal of Hygiene*. 1938. n. 3. v. 27.

RHODES, K. R.; RIMLER, R. B. Fowl cholerae. In: CALNECK, B. W. et al. *Diseases of Poultry*. Iowa State Univesity Press. 1991.p. 145-162.

SOLTYYS, M.A. *Bacterial and fungi pathogenic to man and animals*. Bailliere, London 1963. p. 276.

RUFFOLO, C. G.; JOST, B. H.; ADLER, B. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in Immunity. *Veterinarian Microbiology*.1997. v. 59. p. 123-137.

SANT´ANNA, R.S. e CERQUEIRA, A. M. F. *Apostila de aulas Práticas de Microbiologia*. Curso de Nutrição. Universidade Federal Fluminense. 2007.

SCHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A. A.; GAUTAM, R.; SINGH, V. P.; CHAUDHURI, P. e SRIVASTAVA, S. K. PCR assay for a rapid detection of *Pasteurella multocida* serogroup A in morbid tissue materials from chickens with fowl cholera. *The Veterinary Journal*. 2003. v.168. p. 349-352.

SCHIVACHANDRA, S.B.; KUMAR, A. A.; GAUTAM, R.; JOSEPH, S.; CHAUDHURI, P.; SAXENA, M. K.; SRIVASTAVA, S. K. e SINGH, N. Detection of

*Pasteurella multocida* in experimentally infected embryonated chicken eggs by PCR assay. Indian Journal of Experimental Biology. 2006. v.44. p.321-324.

SHIVAPRASAD, H. L. A. Pathology of Birds – Na Overview. Avian Pathology Seminar. The Royal College of Pathologists. 2012. p. 01-103.

SONGSEERN, T.; VIRIYARAMPA, S.; SAE-HENG, N.; CHAMSINGH, W.; BOOTDEE, O. e PATHANASOPHON, P. *Pasteurella multocida* associated sinusitis in Khaki Campbell Ducks (*Anas platyrhynchos*). Avian Diseases. 2002. v.47. p. 649-655.

SOOD, S. e VERMA, P. C. Pathology of *Pasteurella multocida* infection on chickens. Indian Journal of Animal Research. 2006. v.40. p.15-19.

SOUZA, G.F. Estabelecimento de um novo índice de patogenicidade para amostras de *E. coli* e o uso de redes neurais artificiais. Tese de Doutorado – UFRGS. 2010. Dados não publicados.

UBABEF – Estatísticas. Acessado em 01/11/2013 às 13:33 horas. <http://www.ubabef.com.br/estatisticas/frango>

USDA – SILVA, J. Foreign Agricultural Service – Global Agricultural information Network. Poultry and Products Annual, Annual Poultry 2013 – 15/08/2013. Gain Report Number: BR 0913.

VERMA, N. D. Type B:2 *Pasteurella multocida* in a outbreak of primary swine pasteurellosis. Indian Journal of Animal Science. 1991. v.61 p.158-160

WHITMANN, W. B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Departamento of Microbiology. University of Georgia. 1957. 7 ed. v.1. p. 395-423.

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

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

ZHANG, P.; FEGAN, N.; FRASER, I.; DUFFY, P.; BOWLES, R.; GORDON, A.; KETTERER, P. J.; SHINWARI, W. e BLACKALL, P. J. Molecular epidemiology of two fowl cholera outbreaks on a free-range layer farm. Animal Research Institute, Queensland Departamento of Primary Industries. 2003. p. 01-12.

APÊNDICE A – Protocolo de aprovação do CEUA/IPVDF.

Ofício n.º 25/12 – CEUA/IPVDF

Eldorado do Sul, 20 de julho de 2012.

Senhor Pesquisador:

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

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

É o parecer.

Atenciosamente,

  
FERNANDO SÉRGIO CASTILHOS KARAM  
Presidente CEUA - IPVDF.

APÊNDICE B - Resultados de análise de micotoxinas (aflatoxinas) na ração fornecida às aves do estudo.

Nº amostra	Lote	Data coleta	Resultado
1	1	18/02	<5,0 ppb
2	2	11/03	5,2 ppb
3	3	08/04	<5,0 ppb
4	4	05/08	15,1 ppb
Média Geral			8,32 ppb

ppb = partes por bilhão

## APÊNDICE C – Laudo dos resultados sorológicos.



Livestock and Poultry Diagnostics

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Certificado de Análise / Certificat de contrôle / Chargen-Prüfprotokoll

Pasteurella Multocida Antibody Test Kit [IDEXX PM]

Product and lot number: 99-09251-LH628	Expiration date: 19 January 2014
Tests per kit: 480	Manufacturing date: Oct 2012
Insert version: 06-01160-08	

<u>KIT COMPONENT</u>	<u>Lot number</u>	<u>KIT COMPONENT</u>	<u>Lot number</u>
Positive control:	LH621	Sample diluent:	EH670
Negative control:	KH595	Wash Solution:	N/A
HRPO conjugate:	LH626	Stop solution:	KH599
Microtiter plates:	HH961	Substrate solution:	019123

**KIT CONTROLS**    Mean negative control optical density = 0.042  
                           Mean positive control optical density = 0.274

<u>SENSITIVITY</u>	<u>Panel Members</u>	<u>S/P</u>	<u>Expected Results</u>
	SN1R	2.61	>1.0
	SN2R	2.11	>1.0
	SN1P	1.04	0.60< - <1.40
	SN3	0.08	<1.0
	SN7	0.00	<1.0

**PLATE CVs**        Microtiter plate coefficient of variation = 9.3%

This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.

This information is released by:

Name: Paula Guerrette, Quality Assurance Auditor I

Signature:

Wednesday, November 07, 2012

IDEXX Laboratories, Inc. - One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA - Tel: +12078560300

Im-QA-613\_F, 00 #09602, Effective Date: 01/13/2012

APÊNDICE D - Distribuição das amostras de *Pasteurella multocida* e seus respectivos índices de patogenicidade.

<b>Amostras com origem de Aves</b>				<b>Amostras com origem de Suínos</b>			
Amostra	IP	Amostra	IP	Amostra	IP	Amostra	IP
720	8,06	PM 650	10	2554	1,75	PROT 1924 12	5,24
794	10	PM 651	8,13	903 CAM	10	PROT 1924 4	5,44
32	8,69	1	2,99	CAMBR	2,6	PROT 1989	6,42
33	5,07	2	7,90	CII4	3,60	25	3,12
800	0,17	3	4,43	FRANGOSUL	7,25	26	4,44
801	10	4	2,29	FII 9 PM	6,65	28	5,81
802	8,87	5	7,80	IPV 717	4,89	29	4,93
804	4,8	6	3,31	JAVALI 1354	3,5	30	6,77
806	6,43	7	7,44	P IV 1	2,42	31	2,1
809	5,46	8	7,57	P2PM	3,79	34	0,33
812	2,17	9	8,26	P313	1,33	797	2
817	4,88	10	9,13	PI05	2,5	798	1,17
818	3,27	11	10	PI33	2,25		
819	5,63	12	10	PII8	6,11		
821	4,69	13	10	PIII 20 PM	1,33		
822	5,17	14	7,82	PIII 9 PM	1,08		
823	10	15	10	PIII4	7,20		
824	4,39	16	10	PM 1/95	8,27		
825	1,33	17	10	PM 1621	1,42		
826	4,56	18	10	PM 1628	7,5		
828	8,6	19	8,51	PM 710	6,31		
850	8,44	20	7,93	PM 759	5,26		
851	7,69	21	10	PM 76	1,25		
852	9,18	22	10	PM CII2	4,73		
853	8,93	23	10	PM FII 14	1,33		
PM 1218	7,69	24	6,93	PM PI21	10		
PM 1308	6,56	27	3,95	PM43	3,89		
PM 1543	7,75			PMPI17	1,58		
PM 649	10			PMPI23	1,67		