THAIS SEBASTIANA PORFIDA FERREIRA

**Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida*
provenientes de animais de companhia**

São Paulo

2011

THAIS SEBASTIANA PORFIDA FERREIRA

**Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida*
provenientes de animais de companhia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2490
FMVZ

Ferreira, Thais Sebastiana Porfida
Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida* provenientes de animais de
companhia / Thais Sebastiana Porfida Ferreira. -- 2011.
62 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São
Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Pasteurella multocida*. 2. Animais de companhia. 3. PCR. 4. PFGE. 5. Genes.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida* provenientes de cães e gatos”, protocolado sob o nº1450/2008, utilizando 150 (cento e cinquenta) cães e 150 (cento e cinquenta) gatos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/10/08 .

We certify that the Research “Isolation and characterization of *P. multocida* from cats and dogs”, utilizing 150 (one hundred fifty) dogs and 150 (one hundred fifty) cats, protocol number 1450/2008, under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Thais Sebastiana Porfida

Título: Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida* provenientes de animais de companhia.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Profa. Dra. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Profa. Dra. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio e dedicação durante toda minha vida.

Ao meu esposo Renato pelo apoio e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos meus queridos irmãos Julia e Francisco

À Prof. Dr. Andrea Micke Moreno pela orientação, ajuda, apoio e oportunidades.

Aos amigos do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia que me ajudaram na realização deste trabalho de uma forma ou de outra, Débora Gobbi, Marina Moreno, Sérgio de Mello Novita Teixeira, Maria Roberta Felizardo, Renata Paixão, Danielle Raimundo, Cleise Ribeiro Gomes, Ana Paula Santos da Silva, Alexandre Abelardo Sanches, Cristina Roman Amigo, Tania Alen Coutinho, Vasco Túlio de Moura Gomes, Jucélia de Jesus Pereira, Maria José Louro, Pedro Henrique Filsner.

Aos secretários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Maria Cristina Paick, Ana Virgínia P. Almeida Prado, Danival Lopes Moreira e aos funcionários Sandra Sanches e Orlando Bispo de Souza .

A todos os animais que contribuíram para realização deste trabalho

A Universidade de São Paulo, e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pelas condições de trabalho proporcionadas.

A Fundação de apoio a pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro -Bolsa processo 2007/08592-3.

Ao Sr. Henri Berghs da empresa Fairport Ltda pela autorização de uso do programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths) para análise dos resultados obtidos neste estudo.

RESUMO

FERREIRA, T. S. P. **Isolamento e caracterização de *Pasteurella Multocida* provenientes de animais de companhia** [Isolation and characterization of *Pasteurella Multocida* from pets]. 2011. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pasteurella multocida é o agente causador de muitas doenças de importância econômica em medicina veterinária e tem sido descrita como um agente de alto potencial zoonótico. No Brasil, ao contrário do que se observa na literatura internacional, informações sobre a frequência deste agente em animais de companhia como cães, gatos e coelhos são inexistentes. O presente estudo teve como proposta isolar cepas de *Pasteurella multocida* a partir de cães, gatos e coelhos, avaliar a frequência deste agente nestas espécies animais, caracterizar os isolados de acordo com o tipo capsular e genes codificadores de fatores de virulência através da reação em cadeia pela polimerase, avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados obtidos e caracterizar as amostras através da PFGE. Foram examinados 640 animais, sendo 191 gatos, 309 cães e 140 coelhos. Dentre os animais examinados 8,1% foram positivos para o isolamento de *P. multocida*, sendo 10,4% dos gatos, 0,9% dos cães e 20,7% dos coelhos avaliados. Dentre as 93 cepas selecionadas 22,5% foram sensíveis a todas as drogas testadas, 77,4% das cepas foram resistentes a pelo menos uma droga utilizada e 5,3% foram apresentavam resistência a três ou mais drogas. Através da PFGE foram observados 39 pulsotipos com índice discriminatório igual a 0,97. Todos os genes codificadores de fatores de virulência foram detectados em pelo menos um isolado, sendo que nenhum destes esteve presente em 100% das cepas avaliadas.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*. Animais de companhia. PCR. PFGE. Genes.

ABSTRACT

FERREIRA, T. S. P. **Isolation and characterization of *Pasteurella multocida* from pets** [Isolamento e caracterização de *Pasteurella Multocida* provenientes de animais de companhia]. 2011. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pasteurella multocida is the causative agent of many diseases of economic importance in veterinary medicine and has been described as an agent a high zoonotic potential. In Brazil, contrary to what is observed in the international literature, information about the frequency of this agent in animals such as dogs, cats and rabbits are nonexistent. This study proposes isolate strains of *Pasteurella multocida* from dogs, cats and rabbits, evaluate the frequency of this agent in these animal species, characterize the isolates according to the capsular type, and genes encoding virulence factors through the reaction polymerase chain, evaluate the antimicrobial resistance profiles of isolates and characterize the samples by PFGE. We examined 640 animals, 191 cats, 309 dogs and 140 rabbits. Among the animals examined were positive 8.1% for the isolation of *P. multocida*, and 10.4% of cats, dogs 0.9% and 20.7% of the rabbits studied. Among the 93 selected strains 22.5% were susceptible to all drugs tested, 77.4% of strains were resistant to at least one drug were used and 5.3% showed resistance to three or more drugs. Through PFGE were observed 39 pulsotipos discriminatory index equal to 0.97. All genes encoding virulence factors were detected in at least one isolated, none of which was present in 100% of the strains evaluated.

Keywords: *Pasteurella multocida*. Pets. PCR. PFGE. Genes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	INFECÇÕES EM PEQUENOS ANIMAIS	11
2.2	INFECÇÕES EM HUMANOS	12
2.3	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE	13
2.4	FATORES DE VIRULÊNCIA	14
2.4.1	Toxinas	14
2.4.2	Proteínas externas de membrana (OMPs)	16
2.4.3	Enzimas	17
2.4.4	Fímbrias	18
2.4.5	Cápsula	19
2.5	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>P. multocida</i>	20
2.5.1	Detecção e identificação através da PCR	21
2.5.2	Caracterização molecular de amostras de <i>P. multocida</i>	23
3	OBJETIVOS	26
4	MATERIAL E MÉTODO	27
4.1	AMOSTRAS	27
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS	27
4.3	BACTERIOLÓGICO	28
4.4	PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	30
4.5	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	31
4.5.1	Extração do DNA	31
4.5.2	Amplificação do DNA (PCR)	32
4.5.3	Detecção do produto de amplificação (amplicon)	35
4.6	ELETOFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)	36
4.7	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID)	37
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	37
5	RESULTADOS	38
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Pasteurella multocida é o agente causador de inúmeras doenças economicamente relevantes em todo o mundo, como a rinite atrófica em suínos, a septicemia hemorrágica em bovinos e búfalos, a broncopneumonia enzoótica em bovinos e ovelhas, a cólera aviária e infecções em coelhos (EWERS et al., 2006). Aves, bovinos, ovinos assim como ratos, cães e gatos também são considerados carreadores do agente (AVRIL et al., 1990; DE JONG, 1999).

Infecções do trato respiratório superior por *P. multocida* são consideradas uma das doenças mais comuns em coelhos de estimação. Os sintomas incluem descarga nasal, espirros e conjuntivite (LANGAN et al., 2000). Nos Estados Unidos mais de 50% dos coelhos adultos destinados à indústria morrem ou são eliminados da produção devido à infecção por *P. multocida* o que representa uma grande perda econômica (EL TAYEB et al., 2004).

No Brasil infecções em animais de produção pela *P. multocida* são muito frequentes como a rinite atrófica dos suínos que raramente ocasiona a morte dos animais, mas reduz consideravelmente o ganho de peso dos mesmos gerando perdas econômicas (BRITO et al., 1993; PIFFER ; CASTRO, 1993).

Cães e gatos são animais de companhia que fazem parte da vida moderna, sendo que seu convívio com os humanos tem se intensificado cada vez mais através dos anos. Desta forma os acidentes domésticos como as mordidas e arranhaduras se tornaram comuns. Talan et al. (1999) reporta que a cada ano milhares de Americanos são mordidos por animais e que 90% dessas mordidas são ocasionadas por cães e gatos, estes autores relatam que 28% a 80% dessas lesões infeccionam.

Griego et al. (1995) relata que a *P. multocida* foi isolada em 50% a 80% dos casos de infecção cutânea em seres humanos causadas por mordidas de gatos e em 25% dos casos de infecção cutânea causadas por mordidas de cães, essas infecções podem resultar em inflamações locais e de linfonodos, podendo ocasionar complicações como abscessos e artrite séptica. Ocasionalmente, *P. multocida* pode estar envolvida em infecções sistêmicas como a meningite e a endocardite, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (BISGAARD, 1993; FREDERIKSEN, 1993; EWERS et al., 2004). Amostras toxigênicas de *P. multocida* têm sido isoladas de humanos com amidalite, sinusite, rinite, pleurite, apendicite e septicemia, reforçando o potencial zoonótico do agente (NIELSEN; FREDERIKSEN, 1990; TURNQUIST, 1995). Atualmente no Brasil estudos voltados para a epidemiologia e caracterização da *P. multocida* são escassos (BRITO et al. 1993; PIFFER; CASTRO, 1993).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES EM PEQUENOS ANIMAIS

Em cães e gatos, predominantemente nos gatos, a *P. multocida* é um componente comum da microbiota oral e do trato respiratório superior (LIU et al., 2003). Bactérias que colonizam a orofaringe são frequentemente aspiradas, e podem estar presentes no trato respiratório inferior por um intervalo de tempo desconhecido, ocasionando ou complicando infecções respiratórias. Em cães e gatos estas infecções bacterianas apresentam como sinais clínicos dispnéia, febre, tosse, corrimento nasal mucopurulento ou seroso, letargia, anorexia e perda de peso (TILLEY; SMITH, 2003).

Os gatos por apresentarem hábitos de caça mais conservados que os cães e por serem criados muitas vezes de maneira mais livre apresentam lesões de pele ocasionadas por mordidas e arranhaduras devido às brigas, essas lesões quando infectadas pela *P. multocida* podem dar origem a abscessos subcutâneos chegando a casos de septicemia em indivíduos imunodeprimidos (LOVE et al., 2000).

Em coelhos a *P. multocida* é um patógeno comum frequentemente associado às doenças do trato respiratório superior. Os coelhos podem ser contaminados imediatamente após seu nascimento e a colonização pelo agente aumenta até os cinco meses de idade, fato que não impede os coelhos adultos de serem infectados (EL TAYEB et al., 2004). A pasteurelose nestes animais pode se apresentar como

rinite com descarga nasal purulenta, pneumonia, otite média, piometra, orquites, abscessos, conjuntivites e septicemia (ROUGIER et al., 2006).

2.2 INFECÇÕES EM HUMANOS

Em humanos a *P. multocida* é um agente frequentemente encontrado em abscessos cutâneos, desenvolvidos após arranhaduras e mordidas de animais de companhia. As infecções podem ser adquiridas tanto através de cães como de gatos, sendo mais comuns àquelas adquiridas através do contato com gatos (LIU et al., 2003). Entretanto, em alguns casos, a infecção ocorre com indivíduos que possuem gatos como animais de companhia, sem que o mesmo tenha sido mordido ou arranhado pelo animal como, por exemplo, em um caso relatado por Liu et al. (2003) onde uma paciente com problemas renais tinha infecções recorrentes de urina devido a *P. multocida*.

Outro exemplo de infecção por *P. multocida* devido ao contato com gatos é dado por Cooke et al. (2004) onde é relatado um caso de peritonite em um paciente renal grave que teve os cateteres de hemodiálise mordidos pelo seu gato de estimação.

Per et al. (2010) descrevem um caso de meningite e empiema subdural, subgaleal e epidural por *P. multocida* em um adolescente de 15 anos após contato com coelho de estimação. O animal morreu subitamente e três dias depois o jovem começou a apresentar os sintomas da infecção. Os autores acreditam que o paciente se infectou ao coçar uma lesão de acne no couro cabeludo após manipular

seu coelho. Neste caso, o adolescente não apresentava histórico de imunossupressão nem de doenças anteriores.

Outro caso de infecção humana relacionada à mordida de coelhos é relatado por Silberfein et al. (2006) em um paciente que sofreu a infecção em um enxerto arterial, 28 meses após a cirurgia realizada para reparar um aneurisma de aorta abdominal. Em ambos os casos citados os pacientes tiveram recuperação total após terapia com antibióticos.

2.3 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

P. multocida pertence à família *Pasteurellaceae* que engloba os gêneros *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus* e diversos outros com maior ou menor semelhança fenotípica e genotípica (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

O primeiro isolamento de uma bactéria do gênero *Pasteurella* ocorreu entre 1880 e 1881, sendo o nome *Pasteurella*, dado em homenagem a Louis Pasteur, que em 1887 isolou o agente em casos de cólera aviária de perus (MUTTERS et al., 1989; HUNT et al., 2000).

P. multocida é uma espécie heterogênea subdividida em três subespécies de acordo com os padrões de fermentação de carboidratos (MUTTERS et al., 1985). A *P. multocida* subsp. *multocida* que inclui a maior parte das amostras que causam infecção em humanos, bovinos, suínos, aves domésticas, gatos e coelhos, a *P. multocida* subsp. *septica* tem sido isolada em felinos e aves silvestres e a *P.*

multocida subsp. *gallicida* tem sido descrita em aves e suínos (BLACKALL et al., 1997).

O agente é um cocobacilo ou bacilo curto com largura de 0,5 a 1 µm e comprimento variando de 1 a 2 µm. Trata-se de uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa, imóvel, não hemolítica, produtora de indol, positiva para catalase e oxidase e negativa para urease. Em esfregaços frescos corados pelas técnicas de Giemsa ou Wrigth o organismo apresenta coloração bipolar (MUTTERS et al., 1989).

A espécie *P. multocida* apresenta cinco tipos capsulares, A, B, D, E e F. Além da classificação baseada nos componentes capsulares as amostras de *P. multocida* podem ser classificadas de acordo com os antígenos somáticos. Até o momento foram identificados 16 sorotipos somáticos (PIJOAN, 1999).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

2.4.1 Toxinas

Algumas amostras de *P. multocida* são capazes de produzir uma toxina protéica de 145 kDa, também conhecida como toxina dermonecrótica ou proteína Tox A (LICHTENSTEIGER et al., 1996). Esta toxina é termolábil, letal para

camundongos quando administrada pela via intraperitoneal e causa lesão dermonecrótica em cobaio (DE JONG, 1980; DE JONG, 1999).

A toxina produzida pela *P. multocida* tem a habilidade de alterar a morfogênese de um tecido ou órgão. Esta toxina está diretamente envolvida nos casos de rinite atrófica em suínos. Nestes casos este processo se dá nos ossos turbinados nasais. As alterações nos ossos turbinados incluem um aumento no número de osteoclastos e uma progressiva degeneração dos osteoblastos (PEDERSEN ; ELLING, 1984). Estes tipos celulares juntos são responsáveis pelo processo de formação e remodelamento dos ossos. Os osteoblastos produzem as camadas de tecido ósseo e controlam a atividade dos osteoclastos. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, necessária para o remodelamento e crescimento ósseo. A toxina altera o equilíbrio entre a produção e reabsorção de tecido ósseo em favor da reabsorção. Como consequência o osso desaparece e eventualmente é substituído por células mesenquimais proliferadas (MULLAN; LAX,1998).

Estudos com diferentes linhagens de cultivos celulares mostraram que a toxina é um dos mais potentes fatores de crescimento conhecidos, sendo capaz sozinha de se ligar à célula, penetrar na mesma, alterar o metabolismo lipídico e ativar mecanismos de crescimento e divisão celular (STERNER-KOCK et al.,1995).

Não foi possível estabelecer a importância da toxina na patogenia de infecções pulmonares por *P. multocida*, embora alguns autores descrevam o isolamento de amostras toxigênicas a partir de pulmões de suínos. Amostras toxigênicas de *P. multocida* também são descritas causando doença em outras espécies como coelhos, caprinos, ovinos, aves, e bovinos (PIJOAN et al., 1984; IWAMATSU; SAWADA, 1988).

2.4.2 Proteínas externas de membrana (OMPs)

As proteínas externas de membrana funcionam como barreiras seletivas que impedem a entrada de muitas moléculas tóxicas na célula, propriedade crucial para sobrevivência da bactéria em muitos ambientes. Ao mesmo tempo, estas proteínas exercem vários papéis na célula bacteriana, como absorção de nutrientes, transporte de moléculas para dentro e para fora da célula, além de interagirem com o tecido do hospedeiro e com o ambiente (HATFALUDI et al., 2010).

O interesse crescente nas OMPs é devido a suas propriedades imunogênicas, o que faz destas proteínas candidatas potenciais a produção de vacinas (LU et al., 1991). No entanto, algumas destas proteínas também atuam diretamente como fatores de virulência (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

A necessidade de ferro e a capacidade de adquiri-lo *in vivo* têm sido descrita em diversas espécies, sendo os sistemas de captação de ferro considerados fatores de virulência (LEE et al., 1991). Proteínas externas de membrana de alto peso molecular têm sido especuladas como possíveis responsáveis pela captação de ferro em amostras de *P. multocida*, devido a sua expressão em meios de cultura com quantidades limitadas de ferro (ZHAO et al., 1995). A produção de quelantes de ferro de baixo peso molecular, semelhantes à sideróforos também tem sido cogitada (HU et al., 1986).

As OMPs de *P. multocida* também podem estar envolvidas na adesão à células alvo. Uma proteína de 35 kDa presente na cápsula de uma amostra de origem bovina do tipo A foi descrita como um possível fator de adesão. Anticorpos

específicos contra esta proteína inibiram significativamente a adesão das OMPs a preparados de mucosa respiratória (LÜBKE et al., 1994).

Truscott e Hirsh (1988) observaram uma OMP com atividade antifagocítica em uma amostra de *P. multocida* aviária. Perus que receberam anticorpos específicos contra esta proteína de 50 kDa foram protegidos quando desafiados com uma amostra virulenta de *P. multocida*.

2.4.3 Enzimas

Uma das enzimas mais estudadas em amostras de *P. multocida* é a neuraminidase. Apesar de esta enzima ser descrita em diferentes espécies de *Pasteurella* e outras espécies de bactérias, o papel desta enzima na virulência das amostras permanece obscuro (RIMLER; RHOADES, 1989). Com base em diversas investigações descobriu-se que todos os tipos capsulares e somáticos de *P. multocida*, com exceção do tipo capsular F, produzem uma neuraminidase que difere da produzida por outros microrganismos por apresentar alto peso molecular (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

A neuraminidase atua removendo o ácido siálico de glicoproteínas e glicolípídeos. Sugere-se que o efeito protetor de glicoproteínas salivares contra eventuais patógenos seja reduzido na presença de moléculas de neuraminidase. O mesmo efeito inibitório tem sido descrito para glicoproteínas séricas (principalmente transferrinas) de humanos, coelhos e bovinos (RIMLER; RHOADES, 1989). A

relevância destes modelos para neuraminidase na patogenia da cólera aviária ou nas infecções em suínos permanece incerta (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

Outras enzimas têm sido descritas em amostras de *P. multocida*, mas sua importância na virulência do agente não é conhecida, dentre elas está a hialuronidase, a fosfatase alcalina, a esterase, a lipase, a leucina aminopeptidase, a fosfatase ácida, e a fosfohidrolase (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997).

2.4.4 Fímbrias

Fímbrias são apêndices bacterianos filamentosos de natureza protéica, visíveis através de microscopia eletrônica. A maioria das fímbrias bacterianas apresenta uma forte afinidade adesiva pela superfície de hemácias e outros tipos de células de animais, plantas e fungos (DUGUID et al., 1966; BOROWSKI, 2001).

O papel das fímbrias na virulência de diversas espécies é amplamente documentado, onde sua presença está associada à patogenicidade e a colonização da célula hospedeira (DOUGHTY; RUFFOLO; ADLER, 2000). O isolamento de amostras fimbriadas de *P. multocida* tipo A e tipo D têm sido descritas por diferentes autores em aves, suínos e coelhos (GLORIOSO et al., 1982; PIFFER; CASTRO, 1993; TRIGO; PIJOAN, 1988).

Em isolados de *P. multocida* capazes de causar cólera aviária foi isolada e caracterizada a fimbria tipo 4 expressa pelo gene *ptfA* (DOUGHTY; RUFFOLO;

ADLER, 2000). Estas fimbrias são compostas por repetidas subunidades protéicas de aproximadamente 15 a 20 KDa de massa, cuja a seqüência de aminoácidos terminais é altamente conservada (HATFALUDI et al., 2010).

O fato da *P. multocida* freqüentemente abrigar o gene *ptfA* independentemente do tipo capsular e o fato deste tipo fimbrial ser altamente expresso em células do trato respiratório superior do hospedeiro tanto quanto *in vitro*, sugerem que as fimbrias do tipo 4 são candidatas potenciais para formulação de vacinas para pasteurelose. Entretanto o seqüenciamento do gene *ptfA* de vários isolados de *P. multocida* mostraram alto grau de variação o que pode limitar o potencial de uma vacina baseada em antígenos fimbriais (EWERS et al., 2006).

2.4.5 Cápsula

A maioria das amostras de *P. multocida* possui uma cápsula similar à observada na superfície celular de várias espécies bacterianas. Esta cápsula é composta por polissacarídeos polianiônicos altamente hidratados, os quais são ligados covalentemente à superfície celular por moléculas de lipídio A (ROBERTS, 1996). Polissacarídeos são compostos por repetições de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e formam um grupo muito diverso. Esta diversidade dos polissacarídeos capsulares é de significativa importância na patogênese das doenças sistêmicas (MOXON; KROLL, 1990).

Carter (1955) foi o primeiro a relatar tipos capsulares específicos para *P. multocida*, posteriormente Later, Rimler e Rhodes (1989) descreveram os cinco tipos distintos de cápsulas (A, B, D, E e F). Em suínos os tipos capsulares A e D de *P. multocida* costumam estar associados a pneumonias e a rinite atrófica, em bovinos o tipo capsular A está associado a quadros de pneumonia e o tipo B a quadros de septicemia hemorrágica (ARUMUGAM et al, 2011). O tipo capsular A também é encontrado em isolados de doenças respiratórias de coelhos (EL TAYEB; MORISHITA; ANGRICK, 2004).

A cápsula de *P. multocida* tem sido relacionada à virulência, pois amostras com cápsula apresentam maior resistência à fagocitose e ao efeito bactericida do complemento (SNIPES et al., 1986). Mutantes acapsulares de uma série de microrganismos apresentam virulência reduzida (BOYCE et al., 2000). No caso de *P. multocida* do tipo A, cepas acapsulares, se mostraram avirulentas em galinhas e incapazes de se estabelecerem no tecido muscular destas (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006).

2.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *P. multocida*

Desde o primeiro isolamento em 1881, a detecção, a identificação e a caracterização de *P. multocida* limitou-se a habilidade de cultivar e purificar o microrganismo em laboratório. O agente purificado era então classificado de acordo com suas características fenotípicas, como morfologia da colônia, padrão de

fermentação de carboidratos, como L-arabinose, dulcitol, D-glucose, D-lactose, maltose, D-manitol, D-sorbitol, D-sacarose, D-trealose e D-xilose, e de acordo com suas propriedades sorológicas (DZIVA et al., 2008). No entanto, condições relativas ao cultivo do agente podem influenciar na expressão destes atributos diminuindo a estabilidade e a repetitividade dos métodos fenotípicos usados para caracterização das amostras (MATSUMOTO; STRAIN, 1993).

Recentemente, a identificação e a caracterização têm favorecido análises que refletem uma das propriedades mais fundamentais de um organismo, seu código genético. A caracterização genotípica possui uma versatilidade que ultrapassa as fronteiras da caracterização fenotípica por métodos tradicionais. A análise do ácido nucléico facilita a identificação e a rápida detecção de um microrganismo, a determinação de sua posição taxonômica e a investigação de relações genéticas intra-espécie. As diversas ferramentas de análise molecular têm sido amplamente aplicadas na identificação e caracterização de amostras de *P. multocida* (HUNT et al., 2000).

2.5.1 Detecção e identificação através da PCR

A utilização da PCR na caracterização de amostras de *P. multocida* foi descrita inicialmente em 1994 quando *primers* específicos para seqüência codificadora da proteína ToxA ou toxina dermonecrótica foram desenvolvidos por Nagai et al. (1994). Subseqüentemente, outros testes baseados na PCR foram

descritos para detecção de amostras toxigênicas de *P. multocida* (KAMP et al., 1996; LICHTENSTEIGER et al., 1996). Dentre as reações descritas, a desenvolvida por Kamp et al. (1996) parece ser a mais sensível e efetiva para análise em larga escala de suabs nasais e de tonsila (HUNT et al., 2000).

Para identificação de amostras de *P. multocida* foram descritas algumas metodologias utilizando a PCR. Kasten et al. (1997), descreve a utilização de primers construídos para amplificar o gene *psl* de *P. multocida*, que codifica uma proteína similar a proteína P6 de *Haemophilus influenzae* e *H. parainfluenzae*. Townsend et al. (1998) desenvolveram PCR baseada na amplificação de uma sequência denominada KMT1 específica para o agente e identificada através de hibridização subtrativa. Liu et al (2004) desenvolveu a PCR para detecção de *P. multocida* baseado em dois genes que supostamente regulam a transcrição (Pm 0762 e Pm 1231), sendo que estes genes parecem ser bastante específicos para *P. multocida*.

A partir da identificação de uma região no genoma bacteriano específica para amostras do tipo capsular B e posteriormente para o tipo A, foi possível identificar outras regiões codificadoras de proteínas da cápsula e desenvolver uma reação sob a forma de Multiplex (M-PCR) capaz de diferenciar as amostras de *P. multocida* tipo capsular A, B, D, E e F (TOWNSEND et al., 2001).

2.5.2 Caracterização molecular de amostras de *P. multocida*

A caracterização fenotípica tem oferecido informações limitadas ou insuficientes para estudos epidemiológicos sobre amostras de *P. multocida*, principalmente quando se pretende realizar a diferenciação de cepas muito próximas (HUNT et al., 2000). A caracterização molecular como conhecemos hoje, oferece uma grande variedade de metodologias com especificidade, reprodutibilidade e poder discriminatório variáveis, muitas das quais têm sido descritas para diferenciar amostras de *P. multocida* fenotipicamente semelhantes com sucesso (HUNT et al., 2000).

Uma série de técnicas moleculares, incluindo análise por enzimas de restrição (restriction enzyme analysis – REA), amplificação randômica de regiões polimórficas (RAPD), ribotipagem, Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) ou eletroforese em campo pulsado (PFGE), têm sido empregados em estudos epidemiológicos incluindo diferentes cepas de *P. multocida* os resultados indicam a existência de uma diversidade genômica considerável entre as cepas (SHIN et al., 2007).

A REA mostrou seu poder discriminatório quando isolados de suínos de *P. multocida* pertencentes ao mesmo sorotipo e tipo capsular foram diferenciados (HAREL et al., 1990) e também através da diferenciação de isolados de *P. multocida* causadores de rinite atrófica em suínos (GARDNER et al., 1994).

Informações significantes sobre a diversidade genética e estrutura populacional dentro dos isolados de *P. multocida* tem sido reveladas usando a

ribotipagem. Este método tem caracterizado isolado de *P. multocida* de diversos países como Zimbábue, Tanzânia e Dinamarca (DZIVA et al., 2008).

O AFLP tem sido amplamente utilizado em estudos envolvendo a epidemiologia molecular de bactérias Gram negativas e Gram positivas (JANSSEN et al., 1996 ; VELAPPAN et al., 2001). Este método envolve a digestão do DNA bacteriano purificado com uma ou duas enzimas de restrição, seguido pela ligação dos fragmentos resultantes a um oligonucleotídeo adaptador de fita dupla, o qual é complementar a seqüência de bases do sítio de restrição. Os adaptadores são desenhados de forma que os sítios de restrição originais não sejam restabelecidos após a ligação, o que previne uma nova digestão enzimática. A amplificação seletiva destes fragmentos através da PCR é realizada utilizando-se pares de primers complementares à seqüências dos adaptadores. Os fragmentos de DNA amplificado pela PCR são analisados através da eletroforese em gel de agarose (MCLAUCHLIN et al., 2000).

Eletroforese em gel de campo pulsado

A técnica de eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) permite a separação de fragmentos de grandes dimensões. Nos métodos eletroforéticos convencionais, a separação de moléculas lineares de DNA (até 50 kb) é efetuada em função da sua massa molecular, quando se aplica um campo elétrico unidirecional. O limite de resolução é atingido quando o raio de giro da molécula de DNA excede o tamanho médio do poro do gel forçando as moléculas a percorrerem um percurso sinuoso e a mobilidade eletroforética passa a ser independente da massa molecular. Na eletroforese em campo pulsado utilizam-se campos elétricos alternados que forcem as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção. Esta separação é baseada no maior tempo que moléculas de maior dimensão levam a mudar de direção de migração. Quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação e é nesta diferença dos tempos de reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afeta a separação das moléculas é o tempo do pulso, que é a duração da aplicação do campo elétrico numa dada direção (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

A PFGE por ser uma técnica de boa reprodutibilidade e com ótimo poder discriminatório tem sido muito utilizada e considerada a metodologia padrão (*gold standard*) na epidemiologia molecular (SCHWARTZ; CANTOR, 1984; GOERING, 1993).

3 OBJETIVOS

- Avaliar a frequência de *Pasteurella multocida* a partir de suabes da mucosa oral de gatos, cães e coelhos provenientes do Estado de São Paulo.
- Caracterizar os isolados de acordo com o tipo capsular, produção de toxina dermonecrótica e avaliar a ocorrência dos genes codificadores de fatores de virulência descritos.
- Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados obtidos.
- Avaliar a similaridade dos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foi analisado um total de 309 amostras de suabes de gengiva de cães, 191 suabes de gengiva de gatos e 178 suabes nasais de coelhos. As amostras foram coletadas entre fevereiro de 2008 e abril de 2011 (Tabelas 1 e 2).

Os animais testados no presente estudos apresentaram diversas origens como proprietários particulares, organizações não governamentais de proteção (ONGS), canis, gatis e criatórios de coelhos, todos situados em municípios do Estado de São Paulo.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas com suabes estéreis acondicionados em meio de transporte de Stuart. Os tubos plásticos contendo os suabes foram mantidos sob refrigeração até o processamento, no período de 12 à 24h após a coleta (Figura 1).

4.3 BACTERIOLÓGICO

O isolamento de *P. multocida* foi realizado segundo descrito por Knight et al, (1983). O suabe foi semeado em ágar sangue de cavalo contendo fosfato de clindamicina (5mg/l), sulfato de gentamicina (0,75 mg/l) e telurito de potássio (5 mg/l) e incubado por 24h a 37° C em aerobiose. As colônias suspeitas foram submetidas às provas bioquímicas como a produção de catalase, oxidase, descarboxilação da ornitina (DCO), atividade de urease e habilidade de produzir indol segundo descrito por Christensen et al. (2005).

A reação em cadeia pela polimerase foi utilizada para confirmação da espécie (TOWNSEND et al., 1998). As cepas identificadas como *P. multocida* foram estocadas a -86° C até o momento de realização da PFGE.

Figura 1- Diagrama esquemático descrevendo as atividades laboratoriais

4.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de disco-difusão foi preparado à partir dos cultivos puros de *P. multocida* semeado em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37 °C. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente 1 a 2 X 10⁸ UFC/mL.

Um suabe estéril foi introduzido no interior do tubo contendo a suspensão bacteriana ajustada, pressionado contra a parede do tubo a fim de remover o excesso da suspensão embebida na extremidade do suabe e então, estriado por toda a superfície do ágar Mueller Hinton com sangue de carneiro 5%.

Após a semeadura do inóculo sobre a superfície do ágar, os discos impregnados com princípios antimicrobianos foram distribuídos individualmente. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: ceftiofur, penicilina, amoxicilina, florfenicol, norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacina, tetraciclina, doxiciclina, sulfonamidas, cotrimoxazol, eritromicina.

As placas contendo inóculo e discos antimicrobianos foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas e então, examinadas quanto à formação de halos de inibição ao redor dos discos.

Os diâmetros dos halos de inibição formados no estudo foram interpretados conforme o quadro 1.

Agentes antimicrobianos	Halo de inibição (mm)		
	S ^a	I ^b	R ^c
Amoxicilina	≥18	14-17	≤13
Ceftiofur	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cotrimoxazol ^d	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Doxiciclina	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Enrofloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Norfloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Ciprofloxacina	≥21	16-20	≤15
Eritromicina	≥23	14-22	≤13
Florfenicol	≥ 22	19 - 21	≤ 18
Penicilina	≥28	20-27	≤19
Sulfonamidas	≥ 17	13 - 16	≤ 12
Tetraciclina	≥ 23	19 - 22	≤ 18

^A sensível, ^b intermediário, ^c resistente e ^d associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

¹ CLSI – M31-A3 (2008)

² CLSI – M100-S15 (2005)

Quadro 1 - Critérios para interpretação dos halos de inibição do teste de disco-difusão

4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.5.1 Extração do DNA

O genoma bacteriano foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do isotiocianato de guanidina junto às

propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA; este método foi descrito por Boom et al. (1990).

4.5.2 Amplificação do DNA (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles dos *primers* específicos para o agente e para os genes pesquisados (Quadro 2, 3 e 4), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl .

Alvo	Gene	Nome	Sequencia (5'-3')	Amplicon (pb)
Espécie				
<i>P. multocida</i>	KMT1	KMT1T7 KMT1SP6	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460
Cápsula				
A	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-FWD CAPA-REV	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1.044
B	<i>bcbD</i>	CAPB-FWD CAPB-VER	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	760
D	<i>dcbF</i>	CAPD-FWD CAPD-VER	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657
E	<i>ecbJ</i>	CAPE-FWD CAPE-VER	TCCGCAGAAAATTATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511
F	<i>fcvD</i>	CAPF-FWD CAPF-REV	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851

Fonte: Townsend et al. (1998)

Quadro 2 - Sequência de *primers* utilizados para identificação de *P. multocida* e para tipagem capsular

Primer	Seqüência do primer (5'-3')	Gene	Referencia
Pm 1 A Pm 1 B Pm 3 A Pm 3 B	GGTCAGATGATGCTACATACTCC CCAAACAGGGTTATATTCTGGAC CAAGTCTTAACCTCCACAAGG GGGCTTACTGAATCACAAGAGCC	<i>toxA</i>	Kamp et al, 1996
P6 s P6 as	TCTGGATCCATGAAAACTAACTAAAGTA AAGGATCCTTAGTATGTCAACACAGGACGACG	<i>psl</i>	Kasten et al. (1997)
OmpH s OmpH as	CGCGTATGAAGGTTAGGT TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	<i>ompH</i>	Ewers et al, (2006)
Oma87s Oma87-1 as	ATGAAAAAAGCTTTTAATTGCGAGC TGAAGTTCGCGAGTTGCATAAC	<i>oma87</i>	Ewers et al, (2006)
Fim4 s Fim4 as	TGTGGAATTCAGCATTCTTAGTGTGTC TCATGAATTCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG	<i>ptfA</i>	Doughty et al. (2000)
TbPA s TbPA as	TTGGTTGGAACCGTAAAAGC TAACGTGTACGCAAAAGCCC	<i>tbPA</i>	Ewers et al, (2006)
NanB1 s NanB1 as	GTCCTATAAAGTGACGCCGA ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	<i>nanB</i>	Ewers et al, (2006)
NanH1 s NanH1 as	GAATATTTGGGCGGCAACA TTCTCGCCCTGTCTCACT	<i>nanH</i>	Ewers et al, (2006)
ExbB s TonB as	GGTGGTGATATTGATGCGGC GCATCATGCGTGACGGTT	<i>exbBD</i> <i>tonB</i>	Ewers et al, (2006)
SodA s SodA as	TACCAGAATTAGGCTACGC GAAACGGGTTGCTGCCGCT	<i>sodA</i>	Ewers et al, (2006)
SodC s SodC as	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA TGGTGCGGGTGATCATCATG	<i>sodC</i>	Lainson et al. (1996) e Ewers et al, (2006)
Pfha1 s Pfha1 as	AGCTGATCAAGTGGTGAAC TGGTACATTGGTGAATGCTG	<i>pfhA</i>	Ewers et al, (2006)
HgbA s HgbA as	TGGCGGATAGTCATCAAG CCAAAGAACCACTACCCA	<i>hghA</i>	Ewers et al, (2006)
HgbB s HgbB as	ACCGCGTTGGAATTATGATTG CATTGAGTACGGCTTGACAT	<i>hgbB</i>	Ewers et al, (2006)
FimA s FimA as	CCATCGGATCTAAACGACCTA AGTATTAGTTCCTGCGGGTG	<i>fimA</i>	Tang et al, (2009)
Hsf-1 s Hsf-1 as	TTGAGTCGGCTGTAGAGTTG ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC	<i>Hsf1</i>	Tang et al, (2009)
Hsf-2 s Hsf-2 as	ACCGCAACCATGCTCTTAC TGAAGTACATCGGCGGTAC	<i>Hsf2</i>	Tang et al, (2009)
TadD s TadD as	TCTACCCATTCTCAGCAAGGC ATCATTTTCGGGCATTCACC	<i>tadD</i>	Tang et al, (2009)
Fur s Fur as	GTTTACCGTGTATTAGACCA CATTACTACATTTGCCATAC	<i>fur</i>	Tang et al, (2009)
PmHAS s PmHAS as	TCAATGTTTGCGATAGTCCGTTAG TGGCGAATGATCGGTGATAGA	<i>pmHA</i>	Tang et al, (2009)
OmpA s OmpA as	CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC CATAAACAGATTGACCGAAACG	<i>ompA</i>	Tang et al, (2009)
PlpB s PlpB as	TTTGGTGGTGCGTATGTCTTCT AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	<i>plpB</i>	Tang et al, (2009)

Quadro 3 - Seqüência dos primers para detecção dos genes codificadores de fatores de virulência de *P. multocida*

Reação	Genes	Fragmentos (pb)
FV1	<i>hgbA, ptfA, hgbB, exbBD/tonB</i>	419, 488, 788, 1144
FV2	<i>nanH, psl, nanB</i>	360, 439, 584
FV3	<i>ompH, oma87</i>	438, 949
FV4	<i>pfha, sodC</i>	275, 235
FV5	<i>sodA</i>	361
FV6	<i>tbPA</i>	728
FV7	<i>fimA; pmHAS; Ompa</i>	866; 430; 201
FV8	<i>hsf1; hsf2; fur</i>	654; 433; 244
FV9	<i>tadD; plpB</i>	416; 282

Quadro 4- Reações utilizadas para detecção dos genes codificadores de fatores de virulência e tamanho dos fragmentos amplificados

4.5.3 Detecção do produto de amplificação (amplicon)

A detecção dos produtos de amplificação (10µl produto e 1µl do corante Blue Green®) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA). O gel foi fotografado através de luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação convencional (Image Master, GE Healthcare). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador 100 bp DNA Ladder.

4.6 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

As amostras foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 , foi incorporada em agarose de baixo ponto de fusão e, após homogeneização, transferidas para moldes plásticos. Os *plugs* de agarose resultantes contendo a amostra foram então submetidos a um processo de lise *in situ* e, posteriormente, estocados em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do *plug* foi submetida à digestão com a enzima de restrição (*ApaI*) e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida num período de 20h a 6V/cm, ângulo fixo de 120° , com pulso inicial de 2,0s e final de 20s, em tampão TBE 0,5X mantido a 14°C . O gel foi corado por 20 minutos hora em corante Gel red® (Biotium) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultravioleta em sistema de foto-documentação ImageMaster® (GE Healthcare). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFG Marker (New England Biolabs).

4.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID)

Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para análise estatística dos fragmentos obtidos através da PFGE foi utilizado o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada por este coeficiente foi possível determinar os grupos pelo método de UPGMA (“Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average”), que está representado pela forma de dendrograma. As amostras que apresentaram quatro ou mais bandas diferentes foram classificadas em diferentes pulsotipos.

5 RESULTADOS

Foram examinados 640 animais, sendo 191 gatos, 309 cães e 140 coelhos. A partir das culturas obtidas destes animais foram selecionadas 511 colônias com morfologia e características bioquímicas sugestivas para *Pasteurella* spp, destas, 93 foram confirmadas como *P. multocida* através das provas bioquímicas e da PCR.

Dentre os animais examinados 8,1% foram positivos para o isolamento de *P. multocida*, sendo que entre os gatos avaliados a frequência de positivos foi 10,4%, entre os cães foi de 0,9% e entre os coelhos de 20,7%. O número de animais positivos nos diferentes meses de coleta e a origem das amostras são descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Resultados obtidos nas coletas realizadas em cães e gatos entre fevereiro de 2008 e dezembro de 2010

Ano/Mês		Cães			Gatos		
		Testado	Positivo	Origem	Testado	Positivo	Origem
2008	Fevereiro	3	0	Clínica	7	0	Clínica
	Março	10	0	Clínica	13	1	Clínica
	Maio	4	0	Clínica	4	3	Clínica
	Julho	9	0	Clínica	3	0	Clínica
	Agosto	40	1	Canil	18	1	Clínica
	Novembro	7	0	Clínica	0	0	-
	Dezembro	6	0	Clínica	1	1	Clínica
2009	Fevereiro	6	0	Clínica	4	1	Clínica
	Março	31	0	Clínica	0	0	Clínica
	Maio	16	0	Clínica	23	3	Gatil
	Junho	31	0	Clínica	17	3	Clínica
	Agosto	9	1	Canil	7	3	Clínica
	Setembro	0	0	-	9	0	Clínica
	Outubro	2	0	Clínica	37	0	Clínica/ Gatil
	Novembro	5	0	Clínica	3	0	Clínica
	Dezembro	3	0	Clínica	1	0	Clínica
2010	Fevereiro	0	0	ONG	29	0	ONG
	Março	53	0	ONG	3	0	Clínica
	Abril	10	0	Clínica	2	0	Clínica
	Maio	6	0	Clínica	0	0	-
	junho	16	0	Clínica	0	0	-
	Julho	13	1	Clínica	3	0	Clínica
	Agosto	4	0	Clínica	5	2	Clínica
	Setembro	2	0	Clínica	0	0	-
	Outubro	3	0	Clínica	0	0	-
2011	Fevereiro	20	0	Canil	2	2	Clínica
Total		289	3		191	20	

Tabela 2- Resultados obtidos nas coletas realizadas em coelhos entre Setembro de 2010 e Abril de 2011.

Ano	Mês	Testados	Positivos	Origem
2010	Setembro	20	2	Coelhario B
	Outubro	40	21	Coelhario A
2011	Fevereiro	27	2	Coelhario D
	Abril	53	4	Coelhario C
Total		140	29	

Determinação do tipo capsular

O tipo capsular foi determinado através da PCR onde das 93 colônias selecionadas 57 eram cápsula tipo A e 36 não foram positivas para nenhum tipo de cápsula.

Deteção do gene codificador da toxina dermonecrótica

Nenhuma das colônias selecionadas apresentou o gene codificador da toxina dermonecrótica.

Deteção dos genes codificadores de proteínas e fatores de virulência

Foram detectadas diferentes frequências dos genes codificadores de diferentes proteínas e fatores de virulência nas 93 cepas testadas. Dado apresentado na tabela 3. Os perfis gerados pela pesquisa dos genes codificadores dos fatores de virulência são apresentados na figura 3.

Tabela 3- Frequência de genes codificadores de proteínas e fatores de virulência nas amostras de *P. multocida* provenientes de cães, gatos e coelhos

Gene	Fator	N. positivos (%)
<i>toxA</i>	Toxina dermonecrótica	0 - (0)
<i>psl</i>	Porina	89 - (94,6)
<i>ompH</i>	Proteína externa de membrana H	80 - (86)
<i>oma87</i>	Proteína externa de membrana 87	86 - (92,4)
<i>ptfA</i>	Subunidade de fimbria tipo 4	72 - (77,4)
<i>tbpA</i>	Proteína ligadora de transferrina	4 - (4,3)
<i>nanB</i>	Proteína associada à membrana externa	90 - (96,7)
<i>nanH</i>	Proteína associada à membrana externa	71 - (76,3)
<i>exbBD e tonB</i>	Proteína transportadora de ferro	72 - (77,4)
<i>sodA</i>	Superoxido desmutase	77 - (82,7)
<i>sodC</i>	Superoxido desmutase	72 - (77,4)
<i>pfhA</i>	Hemaglutinina filamentosa	1 - (1)
<i>hgbA</i>	Proteína ligadora de hemoglobina	59 - (63,4)
<i>hgbB</i>	Proteína ligadora de hemoglobina	52 - (55,9)
<i>fimA</i>	Fimbria	57 - (61,2)
<i>hsf1</i>	Adesina de autotransporte	21 - (22,5)
<i>hsf2</i>	Adesina de autotransporte	45 - (48,3)
<i>tadD</i>	Proteína D de aderência não específica	52 - (55,9)
<i>fur</i>	Proteína reguladora da captação de ferro	9 - (9,6)
<i>pmHAS</i>	Sintase de Hialuronidase	64 - (68,8)
<i>ompA</i>	Proteína externa de membrana A	27 - (29)
<i>plpB</i>	Lipoproteína B	37 - (39,7)

Elektroforese em Campo Pulsado (PFGE)

Todas as 93 cepas selecionadas de *P. multocida* foram analisadas através da PFGE utilizando a enzima *Apal*. O número de fragmentos de DNA gerados por perfil variou entre 7 e 18. Foram observados 39 pulsotipos a partir das 93 cepas testadas, O índice discriminatório obtido pela PFGE foi de 0,97.

A partir dos dendrogramas (Figuras 2 e 3) podem ser observados dois grupos principais I e II, com coeficiente de similaridade inferior a 40%. O grupo I constituiu-se por 16 amostras de cães e gatos em sua maioria exceto por uma amostra de coelho, distribuídas em 6 pulsotipos (P 34,35,36,37,38 e 39), dentre estes o pulsotipo 36 se destaca por ser o mais homogêneo em relação a distribuição dos fatores de virulência (todas as amostras foram positivas para os genes *hgBb*, *exbBD*, *nanH*, *psl*, *nanB*, *ompH*, *oma87*, *sodC*, *sodA* e *pmHAS*) e em relação ao perfil de resistência antimicrobiana onde apenas uma amostra de cão foi sensível a todas as drogas testadas e as outras amostras foram resistentes ao cotrimoxazol. Os animais destes subgrupos pertenciam a proprietários particulares.

O grupo II reuniu 77 amostras, distribuídas em 33 pulsotipos com coeficiente de similaridade entre as mesmas variando entre 40% a 100%. Dentro do grupo II, o subgrupo IIa agrupou 17 amostras de gatos, onde os pulsotipos 28, 31 e 32 agruparam 7 amostras clonais pertencentes a 3 animais diferentes, dentre estes clones as amostras pertencentes ao pulsotipo 32 (94.1 e 94.3) destacam-se por serem resistentes a diferentes drogas antimicrobianas (norfloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfonamidas e cotrimoxazol), nenhuma das amostras clonais apresentou a mesma distribuição de genes para os fatores de virulência.

O subgrupo IIb, por sua vez, foi fragmentado em outros subgrupos, constituídos por diferentes pulsotipos, dentre os quais, destaca-se o subgrupo formado pelos pulsotipos 1 a 11 (Tabela 4) por agrupar 36 amostras de coelhos em com um coeficiente de similaridade variando entre 60 e 100%. Neste subgrupo as amostras alocaram-se de acordo com sua origem e com o perfil de resistência. Por exemplo as amostras pertencentes ao coelhário A foram sensíveis a todas as drogas utilizadas e as amostras pertencentes ao coelhário C.resistentes a sulfonamidas. O pulsotipo 4 foi o único que reuniu duas amostras com distribuição idêntica dos fatores de virulência, as demais amostras tiveram uma distribuição quase constante dos genes *psl*, *nanB*, *pfta*, *sodC* e *tadD*.

Os outros subgrupos reuniram 24 amostras de cães, gatos e coelhos distribuídas em 16 pulsotipos diferentes (P 12 a 27), com coeficiente de similaridade variando entre 42 e 100%. As amostras de gatos pertencentes aos pulsotipos 12 e 15 apresentaram resistência às mesmas drogas (ceftiofur, sulfonamidas e cotrimoxazol) tendo como origem ONGS da cidade de São Paulo. Já as amostras de cães agrupadas nos pulsotipos 14 e 26 foram todas sensíveis às drogas testadas no estudo. Todas as amostras agrupadas nestes pulsotipos (P12 a 27) tiveram em comum a presença do gene *oma87*. O gene *pfha* esteve presente em uma única amostra de cão (P14) dentre todas as amostras testadas no estudo.

Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Dentre as cepas selecionadas 22,5% (21) cepas foram sensíveis a todas as drogas testadas (ceftiofur, penicilina, amoxicilina, florfenicol, norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacina, tetraciclina, doxiciclina, eritromicina, sulfonamidas, cotrimoxazol). 77,4% (72) das cepas foram resistentes a pelo menos uma droga utilizada e 5,3% (5) foram multiresistentes (cepas que apresentavam resistência a três ou mais drogas). A resistência bacteriana foi bastante evidente frente à sulfonamidas e o cotrimoxazol (32 cepas), apenas sete cepas foram resistentes apenas ao cotrimoxazol e 12 resistentes apenas a sulfonamidas, cinco foram resistentes a eritromicina e sete a penicilinas, algumas cepas também foram resistentes à amoxicilina, ceftiofur, enrofloxacin e norfloxacin. Os perfis de resistência podem ser claramente observados na figura 2.

Tabela 4- Caracterização dos pulsotipos gerados através da PFGE em cepas de *P. multocida*

Pulsotipo	Ident.	Espécie ¹	Origem ²	Animal	Capsula
P1	45.1c, 98.3C	Rabbit	Herd A, Herd C	45C, 98C	Cap A, NT ³
P2	24.2c, 37.3c, 92.4bc, 95.1c, 95.2c, 98.1C, 98.2C	Rabbit	Herd A, Herd C	24C, 37C, 92C, 95C, 98C	Cap A
P3	95.3c	Rabbit	Herd C	95C	NT
P4	51.3c, 51.4c, 52.3bc	Rabbit	Herd A	51C, 52C	NT
P5	146.2c, 146.4c, 59.3c, 92.1C	Rabbit	Herd D, Herd A Herd C	146C, 59C, 92C	NT
P6	23.2c, 29.1c, 40.3c, 48.1c, 58.1c	Rabbit	Herd A	23C, 29C, 40C, 48C, 58C	Cap A
P7	46.1C, 51.1C	Rabbit	Herd A	46C, 51C	Cap A
P8	90.2C	Rabbit	Herd C	90C	NT
P9	92.4c	Rabbit	Herd C	92C	NT
P10	39.2C, 59.1C	Rabbit	Herd A	39C, 59C	NT
P11	30.1C, 35.1C, 38.1C, 50.1C, 54.1C, 55.1C, 56.3C, 58.2C	Rabbit	Herd A	30C, 35C, 38C, 50C, 54C, 55C, 56C, 58C	Cap A
P12	176.2	Cat	Shelter	176	Cap A
P13	467.3, 467.4	Cat	Owner	467	NT
P14	466.2	Dog	Owner	466	Cap A
P15	210.4	Cat	Shelter	210	NT
P16	146.6c, 52.4c	Rabbit	Herd D, Herd A	146C, 52C	NT
P17	49.1C, 52.1C	Rabbit	Herd A	49C, 52C	Cap A
P18	191.0	Cat	Owner	191	Cap A
P19	210.1	Cat	Shelter	210	NT
P20	73.3C	Rabbit	Herd B	73C	NT
P21	471.1, 471.2	Cat	Owner	471	NT, Cap A
P22	73.2C, 77.1C, 77.3C	Rabbit	Herd B	73C, 77C	NT
P23	77.2C	Rabbit	Herd B	77C	NT
P24	470.2, 470.3	Cat	Owner	470	Cap A, NT
P25	470.1	Cat	Owner	470	Cap A
P26	459.2, 459.3	Dog	Owner	459	Cap A, NT
P27	185.1	Cat	Shelter	185	NT
P28	262.2, 262.3, 262.4	Cat	Owner	262	Cap A
P29	66.1	Cat	Owner	66	NT
P30	214.2, 221.4	Cat	Shelter	214, 221	Cap A
P31	260.1, 93.1, 93.2, 93.3, 93.4	Cat	Owner	260, 93	Cap A
P32	89.4, 94.1, 94.3	Cat	Owner	89, 94	Cap A
P33	210.2, 260.2, 260.4	Cat	Shelter, Owner	210, 260	Cap A, NT
P34	221.3, 222.3	Cat	Shelter	221, 222	Cap A, NT
P35	466.4	Cat	Owner	466	Cap A
P36	110.1, 110.3, 110.4, 94.4, 95.1, 95.2, 95.4	Dog, Cat	Shelter, Owner	110, 94, 95	Cap A
P37	256.1, 256.2, 256.3, 256.4	Cat	Owner	256	Cap A
P38	153.1c	Rabbit	Herd D	153C	Cap A
P39	223.2	Cat	Shelter	223	Cap A

¹Rabbit = coelho, Dog = cão, Cat= gato; ²Herd= criatório, Owner= proprietário, Shelter= abrigo, ONG;

³ NT- negativa para todos os tipos capsulares.

Figura 2 - Dendrograma criado para análise dos resultados da PFGE baseado no coeficiente de Dice e UPGMA. Cepas de *P. multocida* isoladas de cães, gatos e coelhos

6 DISCUSSÃO

As bactérias da espécie *Pasteurella multocida* têm sido descritas como um grupo geneticamente heterogêneo, dividido em subespécies diferentes como *multocida*, *gallicida*, *séptica* e *tigris*, e que acometem diferentes hospedeiros, causando variadas doenças com relevantes perdas econômicas.

No presente estudo foram avaliadas 93 cepas isoladas de cães, gatos e coelhos, provenientes do Estado de São Paulo. Dentre os resultados obtidos a frequência de isolamento do agente foi inferior ao relatado por alguns autores como Grieco et al. (1995) que relatam frequências de 70 a 90% dos gatos examinados e 50 a 66% dos cães portadores de *P. multocida* na microbiota oral. Esta frequência bastante inferior (10,4% dos gatos e 0,9% dos cães) pode estar relacionada aos métodos de isolamento empregados, a interferência da microbiota oral que dificulta o isolamento do agente, ou a diferenças geográficas.

Uma frequência que varia de sete a quase 100% de *P. multocida* no trato respiratório superior de coelhos de diferentes origens foi relatada por Anina et al. (2009), sendo a frequência encontrada no presente estudo igual a 20,7 %. Relatos de infecção humana a partir do contato com coelhos são bem menos freqüentes que os relatos de contaminação a partir de gatos. Silberfein et al. (2006) descrevem um caso de infecção humana pelo agente após mordida de coelho, este dado associado a alta ocorrência do agente nesta espécie em nosso meio reforça o potencial zoonótico da *P. multocida*.

A PFGE tem sido uma importante ferramenta utilizada para se estabelecer uma relação epidemiológica entre os isolados clínicos de *P. multocida* de humanos que estiveram em contato com animais de estimação ou não e os isolados destes animais em questão (LIU et al., 2003).

A aplicação da PFGE na discriminação de amostras de *P. multocida* sido relatada em vários estudos (TOWNSEND et al., 1997). Marois et al. (2009) em estudo realizado com amostras de *P. multocida* isoladas da orofaringe de suínos e de humanos infectados observaram significantes associações entre os isolados, como uma baixa variabilidade entre estes e a ocorrência de padrões coincidentes entre suínos e humanos sugerindo a possibilidade de transmissão do agente entre as duas espécies (MAROIS et al., 2009).

No presente estudo foi possível observar uma forte tendência de agrupamento das amostras isoladas de coelhos, quando comparadas as de cães e gatos. A maioria das amostras pertencentes ao mesmo animal foram agrupadas no mesmo pulsotipo, no entanto foram observados também animais portando cepas com perfis distintos através da PFGE. Não houve correlação dos grupos formados através das PFGE com os dados obtidos através da avaliação dos perfis de resistência e dos genes codificadores de fatores de virulência.

A partir dos cães, gatos e coelhos positivos foram selecionados 93 isolados. Estes isolados foram submetidos a PCR para toxina dermonecrótica, sendo todos negativos. Este resultado pode estar relacionado ao fato do gene codificador da toxina dermonecrótica ser mais relacionado aos quadros de rinite na espécie suína, sendo descrito em menor frequência também em ovinos e aves (EWERS et al., 2006). Mesmo na espécie suína a prevalência de isolados toxigênicos é baixa e ou se reduz após alguns repiques, pois o gene codificador da toxina não está inserido no cromossomo bacteriano e sim de um bacteriófago lisogênico que infecta o agente (PULLINGER et al., 2004).

Através da PCR, 61,2% das cepas foram positivas para o tipo capsular A, dado também encontrado em outros estudos que relatam a maior ocorrência deste tipo capsular nas três espécies animais avaliadas (ARUMUGAM et al., 2011). Uma característica não esperada das cepas do presente estudo foi a alta frequência de cepas não tipáveis para o gene codificador da cápsula (38,7%) através da PCR. Este número é ligeiramente superior ao estudo mais recente, realizado por Arumugam et al. (2011) usando a mesma reação de PCR descrita por Townsend et al. (1998), onde a frequência de amostras não tipáveis descrita foi de 19,3% (22/114). Outros estudos descrevendo frequências inferiores de cepas não tipáveis através da PCR relatam frequências de 2 a 9% (DAVIES et al., 2003a; b; JAMALUDIN et al., 2005; EWERS et al., 2006; TANG et al., 2009).

Utilizando a sorotipagem através de métodos fenotípicos convencionais, Arumugam et al. (2011) descrevem uma porcentagem ainda maior de cepas não tipáveis, subindo de 19,3% para 48,2% (55/114) das cepas de *P. multocida* avaliadas.

A expressão de um tipo capsular é um fator crítico para o grau de virulência de uma amostra, sabe-se que fatores ambientais como o crescimento na presença de antibióticos, perda de ferro ou de fontes de ferro como a hemoglobina afetam a sua expressão (STEEN et al., 2010). Muitos estudos têm relatado a perda espontânea de cápsulas em isolados de *P. multocida* que sofreram muitas passagens in vitro, mas o mecanismo através do qual estas perdas ocorrem ainda não totalmente foi determinado. Steen et al. (2010) sugerem que uma redução na transcrição dos genes dentro do locus de biossíntese da cápsula, pode ser uma das causas para a perda espontânea de cápsula que ocorre em algumas cepas. (CHAMPLIN et al., 1999; STEEN et al., 2010). No entanto, apesar de haver várias descrições prévias, nenhum dos estudos atuais explica a ausência dos loci relacionados aos tipos capsulares conhecidos até o momento (A, B, D, E e F) através da PCR.

Entre os 93 isolados a prevalência dos genes codificadores de proteínas e fatores de virulência variou de 1% como no caso da hemaglutinina filamentosa (*pfhA*) a 96,7% como no caso das proteínas associadas a membrana externa celular (*nanB*).

No presente estudo o gene codificador da hemaglutinina filamentosa (*pfhA*) foi detectado em apenas uma amostra originada de um cão. Ewers et al. (2006) descrevem uma frequência superior em diferentes espécies, 25% em isolados de cães, 18,5% em gatos e 21,2% em suínos. Em isolados de origem suína Tang et al (2009) descrevem 15% de isolados positivos e Astrid et al. (2009) descrevem 20%.

Segundo Sina et al. (2006) e Ewers et al. (2006), o gene *tbpA* esta intimamente relacionado cepas de ruminantes (bovinos, ovinos e bubalinos), o que justifica sua baixa frequência (4,3%) nas cepas do presente estudo.

Os outros genes codificadores de proteínas com diferentes funções como a aquisição de ferro (*exbBd* e *tonB* – 77,4%), proteínas ligadoras de hemoglobina (*hgbA* -63,4% e *hgbB* - 55,9%), superóxido desmutase (*sodA* – 82,7% e *sodC* – 77,4%), subunidade de fimbria tipo 4 (*ptfA* – 77,4%), porina (*psl* 94,6%) e outras proteínas de membrana (*omph* - 86% e *nanH* – 76,3%) tiveram frequências semelhantes as relatadas por Ewers et al. (2006).

Em contraste com outros estudos como o de Tang et al. (2009), no presente estudo não foi possível associar um determinado fator de virulência a um tipo capsular específico, já que distribuição dos fatores de virulência foi muito heterogênea entre os isolados com tipo capsular A e os isolados não tipáveis.

Infecções causadas por *P. multocida* normalmente são tratadas por um amplo espectro de antibióticos (KEHRENBURG et al., 2001). Os dados de susceptibilidade antimicrobiana do presente estudo indicam que as cefalosporinas (ceftiofur), florfenicol e as fluorquinolonas (ciprofloxacina) são as drogas mais eficazes, fato também relatado em estudos na França, América do Norte e no Japão (KEHRENBURG et al., 2001; SALMON et al., 1995; YOSHIMURA et al., 2001). A resistência dos isolados frente a sulfas e ao cotrimoxazol também é previamente descrita (TANG et al., 2009).

Um isolado de gato apresentou um perfil de multirresistência bem diferente das outras cepas testadas (norfloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, sulfa e cotrimoxazol), este perfil pode ser associado ao uso indiscriminado de antibióticos na prática clínica selecionando cada vez mais resistentes.

Apesar da frequência de isolamento em cães e gatos inferior ao esperado segundo a literatura consultada, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o agente está presente em animais portadores e que estas cepas além de

carrearem uma grande combinação de fatores de virulência também apresentam resistência a vários tipos de antimicrobianos de uso comum em medicina humana.

Os coelhos, que apresentam crescente papel como animais de companhia e também tem sua participação importante como fonte de proteína de origem animal, apresentaram uma frequência relativamente alta de isolamento do agente (20,7%). Sendo, que no caso dos coelhos além do potencial zoonótico do agente há uma significativa perda econômica pelas mortes e descartes de animais nos criatórios.

7 CONCLUSÕES

- A frequência de isolamento *P. multocida* no presente estudo foi maior em coelhos, seguida pelos gatos e pelos cães.
- A maior parte dos isolados das três espécies animais avaliadas pertence ao tipo capsular A e uma alta porcentagem dos mesmos não foi tipável através da PCR.
- Através da PFGE foi possível caracterizar todas as cepas isoladas e discriminar a maior parte dos isolados de coelhos das amostras de cães e gatos.
- Todos os genes codificadores de fatores de virulência foram detectados em pelo menos um isolado, sendo que nenhum destes esteve presente em 100% das cepas avaliadas.

REFERÊNCIAS

ASTRID, B.; LOTHAR, H. W.; HANS-J. S.; CHRISTA E. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and disease swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 97-105, 2009.

ANINA. B. J. S.; RICHARD. K. H.; PETER. K.; BOZENA. M. K. Phenotypic and genetic characterization of *Pasteurella multocida* and related isolates from rabbits in Switzerland. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 793- 802, 2009.

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

AVRIL, J. L.; DONNIO, P. Y. O, POUEDRAS, P. Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1438-1440, 1990.

BISGAARD, M.; ABDULLAHI, M. Z.; GILMOUR, N. J. Further studies on the identification of pasteurellaceae from cattle lungs. **Veterinary Record**, v. 128, p. 428-429, 1991

BLACKALL, P. J.; PAHOFF, J. L.; POWLES, R. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 335-360, 1997.

BLACKALL, P. J.; PAHOFF, J. L.; MAKES, D.; FEGAN, N.; MORROW, C. J. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from fowl cholera outbreaks on turkey farms. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 135-138, 1995.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOROWSKI, S. M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2001 190f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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

BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 153-160, 2000.

BRITO, J. R. F.; PIFFER, I. A.; WENTZ, I.; BRITO, M. A. V. P. Capsular types and toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs in southern Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 24, p. 94-97, 1993.

CHAMPLIN, F. R.; PATTERSON, C. E.; AUSTIN, F. W.; RYALS, P. E. Derivation of extracellular polysaccharide - deficient variants from a serotype A strain of *Pasteurella multocida* **Curr Microbiology**, v. 38, p. 268 - 272, 1999.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M.; ANGEN, O.; FREDERIKSEN, W.; OLSEN, J. E. Characterization of sucrose – negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large – cat bite wounds. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, p. 259- 270, 2005.

CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Avian pasteurellosis: taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. **Avian Pathology**, v. 26, p. 461-483, 1997.

COOKE, F. J.; KODJO, A.; CLUTTERBUCK, E. J.; BAMFORD, K. B. A case of *Pasteurella multocida* peritoneal dialysis-associated peritonitis and review of the literature. **International Journal of Infectious Disease**, v.8, p. 171-174, 2004.

DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; BAILLIE, S.; CAFFREY, B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. . **Journal of medical microbiology**.v. 52, p. 59 -67, 2003a

DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; BAILLIE, S.; CAFFREY, B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. **Veterinary Microbiology**, v. 91, p. 169- 182, 2003b.

DE JONG, M. F. Progressive and non progressive atrophic rhinitis. In: STRAW, B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D. J. (Ed.) **Diseases of swine**. 8. ed. 1999 Iowa University Press. Ames: p. 511-520.

DE JONG, M. F. Some aspects of the study of atrophic rhinitis. **Tijdschr Diergeneesk**, v. 105, p. 711-714, 1980.

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

DUGUID, J. P.; ANDERSON, E. S.; CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 92, p. 107-138, 1966.

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

EL TAYEB, A. B.; MORISHITA, T. Y.; ANGRICK, E. J. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis. **Journal Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 16, p. 121-125, 2004.

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

EWERS, C.; LUBKE-BECKER, A.; WIELER, L. H. *Pasteurella*: insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterium. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr**, v. 9-10, p. 367-386, 2004.

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

GLORIOSO, J. C.; JONES, G. W.; RUSH, H. G. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. **Infection and Immunity**, v. 35, p. 1105-1109, 1982.

GRIEGO, R. D.; ROSEN, T. M. D.; ORENGO, I. F.; WOLF, J. E. Dog, Cat and human bites: A review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, p. 1019-1029, 1995.

HAREL, J.; COTE, S.; JACQUES, M. Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 54, p. 422-426, 1990.

HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 265, p. 1-10, 2006.

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

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

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

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

IWAMATSU, S.; SAWADA, T. Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolates and pneumonic lesions of porcine lung. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 50, p. 1200-1206, 1988.

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

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1993, 1996.

KAMP, E. M.; BOKKEN, G. C. A. M.; VERMEULEN, T. M. M.; DE JONG, M. F.; BUYS, H. E. C. M.; REEK, F. H.; SMITS, M. A. A specific and sensitive PCR assay for large scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 304-309, 1996.

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

KEHRENBURG, C. G.; SCHULZE-TANZIL, J. L.; MARTEL, E.; CHASLUS-DANCLA; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* and *Manheimia*: epidemiology and genetic basis. **Veterinary Resources**, v.32, p. 323-339, 2001.

LEE, M. D.; WOOLEY, R. E.; BROWN, J.; GLISSON, J. R. A survey of potential virulence markers from avian strains of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 26, p. 213-225, 1991.

LICHTENSTEIGER, C. A.; STEENBERGEN, S. M.; LEE, R. M.; POLSON, D. D.; VIMR, E. R. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 3035-3039, 1996.

LIN, P. H.; BUSH, R. L.; ZHOU, W.; LUMSDEN, A. B. Aortic endograft infection due to *Pasteurella multocida* following a rabbit bite. **Journal Vascular Surgery**, v. 43, p. 393-395, 2006.

LIU, W.; CHEMALY, R. F.; TUOHY, M. J.; LASALVIA, M. M.; PROCOP, G. W. *Pasteurella multocida* Urinary Tract Infection with Molecular Evidence of Zoonotic Transmission. **Clinical Infections Diseases**, v. 36, p. 58-60, 2003.

LOVE, D. N.; MALIK, R.; JACQUELINE, M. N. Bacteriological warfare amongst cats: What have we learned about cat bite infection? **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 2179-2193, 2000.

LU, Y.-S.; GERRITY, L. W.; PAKES, S. P.; NIE, L. C. A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurellosis. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 172-180, 1991.

LUBKE, A.; HARTMANN, L.; SCHRODER, W.; HELLMANN, E. Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v. 281, p. 45-54, 1994.

MAROIS, C.; FABLET, C.; GAILLOT, O.; MORVAN, H.; MADEC, F.; KOBISCH, M. Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1830 - 1836, 2009.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MOXON, E. R.; KROLL, J. S. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 150, p. 65-85, 1990.

MULLAN, P. B.; LAX, A. J. *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoclasts via interaction with osteoblasts. **Calcified Tissue International**, v. 63, p. 340-345, 1998.

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

MUTTERS, R.; MANNHEIM, W.; BISGAARD, M. Taxonomy of the group. In: ADLAN, C.; RUTTER, J. M. (Ed.). ***Pasteurella and Pasteurellosis***. London: Academic Press Limited, 1989. p. 3-34.

NIELSEN, J. P.; FREDERIKSEN, W. Atrophic rhinitis in pigs caused by a human isolate of toxigenic *Pasteurella multocida*. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 11., 1990. **Proceeding**: Pig Veterinary Society, 1990. p. 75.

PEDERSEN, K. B.; ELLING, F. The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 94, p. 203-214, 1984.

PIFFER, I. A.; CASTRO, A. F. P. Capacidade hemaglutinante de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos e sua associação com fímbria e dermatotoxicidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 443-454, 1993.

PIJOAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C.; LEMAN, A. D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 185, p. 522-523, 1984.

PIJOAN, C. Pneumonic pasteurelosis In: STRAW, B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. (Ed.) **Diseases of swine**. 8. ed. Ames: Iowa University Press, 1999. p. 511-520.

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

RIMLER, R. B.; RHOADES, K. R. *Pasteurella multocida*. In: ADLAM, C.; RUTTER, J. M. (Ed.) ***Pasteurella e pasteurellosis***. London: Academic Press, 1989. p. 85-113.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria.. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 285-315, 1996.

ROUGIER, S.; GALLAND, D.; BOUCHER, S.; BOUSSARIE, D.; VALLÉ, M. Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 192-198, 2006.

SALOMON, S. A. J. L.; WATTS, C. A.; CASE, L. J.; HOFFMAN, H. C.; WEGENER; YANCEY JR, R. J. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from United States, Canada and Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2435 - 2444, 1995.

SILBERFEIN, E. J.; LIN, P. H.; BUSH, R. L.; ZHOU, W.; LUMSDEN, A. B. Aortic endograft infection due to *Pasteurella multocida* following a rabbit bite. **Journal Vascular Surgery**, v. 43, p. 393-395, 2006.

SINA, A.; JALAL, S.; MOHAMMAD, S. H. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 355-357, 2009.

SNIPES, K. P.; GHAZIKHANIAN, G. Y.; HIRSH, D. C. Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular system of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. **Avian Diseases**, v. 31, p. 254-259, 1986.

SHIN, E. K.; SEO, Y. S.; HAN, J. H.; HAHN, T. W. Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. **J. Vet. Sci.**, v 8, n.1, p.65–73, 2007.

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

STERNER-KOCK, A.; LANSKE, B.; UBERSCHAR, S.; ATKINSON, M. J. Effects of the *Pasteurella multocida* toxin on osteoblastic cells in vitro. **Veterinary pathology**, v. 32, p. 274-279, 1995.

TALAN, D. A.; CITRON, D. M.; ABRAHAMIAN, F. M.; MORAN, G. j.; GOLDSTEIN, E. J. C. Bacteriologic analysis of infected dogs and cats bites. **New England Journal Medicine**, v. 340, p. 85- 92, 1999.

TANG, X.; ZHAO, Z.; HU, J.; WU, B.; CAI, X.; HE, Q.; CHEN, H. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.april, p. 951-958, 2009.

TILLEY, P. L.; SMITH, W. K. F. **Consulta veterinária em 5 minutos espécies canina e felina**, 2ª ed., Editora Manole, 2003.

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

TRIGO, E.; PIJOAN, C. Presence of pili in *Pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. **Veterinary Record**, v. 122, p. 19, 1988.

TRUSCOTT, W. M.; HIRSH, D. C. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. **Infection and Immunity**, v.56, p. 1538-1544, 1988.

TURNQUIST, S. E. Etiology and diagnosis of progressive atrophic rhinitis. **Swine Health and Production**, v. 3, p. 168-170, 1995.

ZHAO, G.; PIJOAN, C.; CHOI, K.; MAHESWARAN, K.; TRIGO, E. Expression of iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 46-50, 1995.

VELAPPAN, N.; SNODGRASS, J. L.; HAKOVIRTA, J. R.; MARRONE, B. L.; BURDE, S. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. **Diagnostic Microbiology Infection Diseases**, v. 39, p. 77-83, 2001

YOSHIMURA, H. M.; ISHIMURA, Y. S. E.; KOJIMA, A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. v. 48, p. 555- 560.