SERGIO DE MELLO NOVITA TEIXEIRA

**Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella multocida*
proveniente de suínos**

São Paulo

2010

SERGIO DE MELLO NOVITA TEIXEIRA

**Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella multocida*
proveniente de suínos**

São Paulo

2010

SERGIO DE MELLO NOVITA TEIXEIRA

**Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella*
multocida proveniente de suínos**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Prof^a. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2010

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.2241
FMVZ

Teixeira, Sergio de Mello Novita
Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella multocida*
proveniente de suínos / Sergio de Mello Novita Teixeira. -- 2010.
39 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. PCR. 2. *Pasteurella multocida*. 3. Suíno. 4. Fatores de virulência.
5. Toxina. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3 ^a	1 ^a	39 f.	40 f.
Resumo	1 ^a	3 ^a	39 f.	40 f.
Abstract	1 ^a	3 ^a	39 f.	40 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização genética de cepas de *Pasteurella multocida* provenientes de suínos", protocolado sob o nº1549/2008, 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 26 de outubro de 2009.

We certify that the Research "Genetic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from swine", protocol number 1549/2008, 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 10/26/09.

São Paulo, 26 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TEIXEIRA, Sergio de Mello Novita

Título: Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella multocida* proveniente de suínos.

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao médico veterinário e
querido avô, Dalgio
Cardoso de Mello pelo
exemplo de profissional e
pela saudade deixada que
jamais será esquecida.

Agradecimentos

Aos meus pais, Antônio José e Maria de Lourdes (Madilu) pelo apoio incondicional durante toda minha pós-graduação e por acreditarem no seu filho.

Aos meus irmãos, Liandra e Paulo por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais preciosos da minha vida.

Ao meu cunhado Ricardo “Tai” Gui e meu pequeno sobrinho e afilhado Ricardinho pelo apoio ao longo de toda jornada.

A Dr^a Andrea Micke Moreno, minha orientadora que me proporcionou esse mestrado ao confiar a mim a realização desse feito.

As grandes amigas que criei dentro do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia, Tania Alén Coutinho, Débora Dirani Sena de Gobbi, Renata Paixão, Maria Roberta Felizardo, Thais Sebastiana Porfida Ferreira, Cleise Ribeiro Gomes, Ana Paula Santos da Silva.

Aos técnicos dos laboratórios Orlando Bispo, Alexandre Sanches e em especial a Sandra Sanches pelos momentos de descontração.

A empresa Suiaves por acreditar no meu valor com os senhores Luiz Eduardo Conte, Estephano Meulman, Victor Marujo e Maurício Dutra, antigo colega do mestrado e agora colega do trabalho.

Um agradecimento especial à minha garota, Daniella Carolina Zanardo Donato, a Dani, que me atura todos os dias e todas as noites ainda diz que me ama!

Por fim a todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização desse feito mas que não estão com seus nomes aqui! Obrigado!!

RESUMO

TEIXEIRA, S. M. N. **Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella multocida* proveniente de suínos**. [Genotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains from swine]. 2010. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Um total de 123 isolados de *Pasteurella multocida* provenientes de suínos foi avaliado através da PCR para pesquisa de genes codificadores de capsula, toxina dermonecrótica e outros fatores de virulência. As amostras foram caracterizadas como tipo capsular A (78,8 %) e tipo capsular D (21%). Nenhum dos isolados foi positivo para presença de toxina dermonecrótica. Os genes codificadores dos fatores de virulência pesquisados foram observados nas frequências de 93,5 % para *nanB*, 92,7% para *psl*, 91,9% para *oma87* e *nanH*, 87,8% para *sodA*, 87% para *hghA*, 83,7% para *ompH*, 82,9% para *sodC*, 79,7% para *ptfA* e *exbBD tonB*, 73,2% para *hgbB*, 14,6% para *pfhA* e 4,9% para *tbpA*. Estes achados são compatíveis com o descrito na literatura internacional.

Palavras-chave: PCR. *Pasteurella multocida*. Suíno. Fatores de virulência.

Toxina

ABSTRACT

TEIXEIRA, S. M. N. Genotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains from swine. [**Caracterização genotípica de cepas de *Pasteurella multocida* proveniente de suínos**]. 2010. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A total of 123 *Pasteurella multocida* strains from swine was evaluated through PCR to detect capsular, dermonecrotic toxin codifying genes and others virulence factors. The strains were identified as capsular type A (78.8 %) and capsular type D (21%). None of isolates were positive to dermonecrotic toxin gene. The virulence factors genes were detected in the following frequency: 93.5 % to *nanB*, 92.7% to *psl*, 91.9% to *oma87* and *nanH*, 87.8% to *sodA*, 87% to *hghA*, 83.7% to *ompH*, 82.9% to *sodC*, 79.7% to *ptfA* and *exbBD tonB*, 73.2% to *hgbB*, 14.6% to *pfhA* and 4.9% to *tbpA*. These findings were in accordance with international literature.

Keywords: PCR. *Pasteurella multocida*. Swine. Virulence Factors. Toxin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	INFECÇÃO EM SUÍNOS.....	15
2.2	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE.....	17
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	18
2.3.1	TOXINAS.....	18
2.3.2	PROTEÍNAS EXTERNAS DE MEMBRANA (OMPS).....	19
2.3.3	ENZIMAS.....	20
2.3.4	FIMBRIAS.....	20
2.3.5	CÁPSULA.....	21
2.4	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>P. MULTOCIDA</i> . 21	
2.4.1	DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DA PCR.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	BACTERIOLÓGICO.....	25
4.2	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS.....	25
4.2.1	EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO.....	25
4.2.2	AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	26
4.3	DETECÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO (AMPLICON).....	28
5	RESULTADOS.....	29
6	DISCUSSÃO.....	31
7	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil vem se destacando ao longo dos últimos anos com um ótimo crescimento de seu plantel, mantendo um papel de destaque entre os principais países exportadores da carne.

Em 2008, o Brasil atingiu a cifra recorde de US\$ 1,48 bilhão em exportações de carne suína, 20% a mais do que em 2007 (US\$ 1,23 bilhão). Em volume, porém, houve uma queda de 77 mil toneladas. Em 2008, o Brasil exportou 529,41 mil toneladas, em relação a 606,51 mil t em 2007. Os preços altos no mercado mundial e a opção estratégica das empresas, que priorizaram preço em detrimento de volume, explicam o bom desempenho das receitas. A redução das quantidades exportadas se deve, em primeiro lugar, ao bom desempenho do mercado interno e, em segundo lugar, à crise financeira internacional e à paralisação do Porto de Itajaí nos dois últimos meses do ano (ABIEPCS, 2009).

O mercado interno, em 2008, esteve bem mais dinâmico do que em 2007 e manteve a tendência observada a partir de 2006. Naquele ano, o consumo doméstico iniciou um processo de lenta recuperação. O aumento da produção de industrializados, sobretudo de linguiças, produtos que chegaram aos consumidores a preços mais competitivos, a ampliação da oferta de cortes frescos e a menor disponibilidade de carne bovina foram os principais fatores responsáveis pela elevação do consumo, atualmente próximo a 14 quilos por habitante ano. A disponibilidade interna cresceu 4,5% em 2008, bem abaixo do potencial de consumo, o que explica a forte sustentação verificada nos preços. Se as exportações não tivessem registrado acentuada queda no final do ano, a carne suína teria faltado no mercado doméstico (ABIEPCS, 2009).

É inegável que a produção de carne suína nos dias atuais com advento de novas tecnologias vem aumentando de forma significativa sua produtividade e, por conseguinte, sua competitividade no mundo. O Brasil, graças ao trabalho sério de grandes empresas, aliados a órgãos competentes como a Embrapa, conseguiu ao longo de décadas melhorar não somente a produção, como também melhorar em

muito a qualidade da carne oferecida, comprovando nos dias atuais que a carne suína, além de saborosa, é absolutamente saudável.

Sendo a carne mais consumida no mundo inteiro, o Brasil não pode fechar os olhos para o potencial que possui de poder se tornar o grande expoente da suinocultura mundial. Para isso ocorrer, cada vez mais é necessário que a tecnologia aplicada seja mais utilizada com intuito de minimizar as perdas que ocorrem dentro de uma granja.

Nos últimos anos um número considerável de estudos tem sido realizado com o objetivo de determinar mecanismos de imunidade, predileção por hospedeiros, virulência e patogenicidade da *P. multocida*, o que vem resultando em uma melhor compreensão do comportamento deste agente.

A caracterização do tipo capsular, fatores de virulência e potencial do agente como possível causador de infecção em humanos é ainda menos estudada. Na suinocultura, sabe-se que esse agente é comumente encontrado em granjas e que sua alta prevalência torna o complexo das doenças respiratórias dos suínos uma das principais causas de prejuízos econômicos ao produtor. Logo, entender a epidemiologia da *P. multocida*, que ainda não está muito bem esclarecida, assim como compreender melhor as características fenotípicas e genotípicas do agente é de suma importância para poderem-se melhorar ainda mais as questões de sanidade em granjas. Assim, com o incentivo da pesquisa no âmbito nacional, a suinocultura poderá incrementar ainda mais os ganhos em sua produtividade, aumentando sua parcela na contribuição de renda aos suinocultores. O presente estudo objetiva-se associar o conhecimento e as técnicas desenvolvidas para caracterização desta espécie bacteriana nas infecções respiratórias em suínos

2 REVISÃO DE LITERATURA

Pasteurella multocida é a espécie mais comum do gênero *Pasteurella*, sendo um importante patógeno em medicina veterinária e humana. Esta bactéria Gram-negativa tem sido identificada como o agente causador de muitas doenças de importância econômica e como um agente de alto potencial zoonótico. No Brasil, as rinites bacterianas e virais, bem como as pneumonias causadas pela *P. multocida* são muito freqüentes (KICH; PONTES, 2001; BOROWSKY et al., 2007), e estudos voltados para a epidemiologia e distribuição destes agentes são escassos.

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., 2004). Aves, bovinos, ovinos assim como ratos, cães e gatos também são considerados carreadores do agente (AVRIL et al., 1990; DE JONG, 1999).

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).

No Brasil infecções em animais de produção pela *P. multocida* são muito freqüentes, e estudos voltados para a epidemiologia e caracterização deste agente são escassos (BRITO et al., 1993; PIFFER; CASTRO, 1993).

As doenças respiratórias que afetam os suínos na fase de terminação, tais como pneumonia enzootica e rinite atrófica ocupam lugar de destaque entre as doenças que afetam os suínos, devido a sua frequência e intensidade com que atingem os sistemas de produção. São consideradas doenças multifatoriais porque sua frequência e grau de severidade dependem, não somente, da(s) característica(s) do(s) agente(s) e da imunidade do rebanho, mas também das condições ambientais em que são criados os animais.

Rinite atrófica foi reconhecida pela primeira vez em 1830. Inicialmente esta denominação passou a englobar praticamente todas as doenças cujo curso ocorriam alterações no focinho do suíno como, por exemplo, o raquitismo. Posteriormente, constatou-se que a doença que cursava apenas com alterações nos cornetos nasais era uma doença específica, passando-se então denominá-la simplesmente de Rinite Atrófica (SOBESTIANSKY et al., 2007).

A rinite atrófica bem como as pneumonias, provocam prejuízos econômicos consideráveis, em virtude da diminuição da média de ganho de peso diário em suínos na fase de terminação, da morte de animais por pneumonias, das despesas com medicamentos e, em nível de indústria, da condenação de carcaças afetadas (SOBESTIANSKY et al., 2007).

2.1 INFECÇÃO EM SUÍNOS

Em suínos a *P. multocida* é um habitante normal da cavidade nasal e um dos agentes etiológicos de uma forma de infecção do trato respiratório superior conhecida como rinite atrófica progressiva (DE JONG et al., 1980). Nessa enfermidade somente cepas toxigênicas de *P. multocida*, sozinhas ou em associação com outros fatores, como infecção prévia por *Bordetella bronchiseptica*, são capazes de causar o problema (PIJOAN, 1992). A lesão da rinite atrófica progressiva (RAP) consiste de hipoplasia dos ossos turbinados nasais, sendo em casos graves acompanhada por diferentes graus de distorção facial e rinorragia (DE JONG, 1999).

A pneumonia geralmente ocorre em associação a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* causando o que Pijoan (1999) denomina complexo das doenças respiratórias dos suínos. Nos casos de pasteurolese pulmonar, descreve-se a ocorrência de forma subaguda, aguda e crônica.

A forma aguda frequentemente está associada a amostras do sorotipo B, sendo que a mortalidade pode ser alta (5 a 40%). Essa forma de infecção é considerada rara e nunca foi descrita na América ou na Europa, sendo apenas relatada na Índia, Sri Lanka e Vietnã (GAMAGE et al., 1995; TOWNSEND et al., 1998; VERMA, 1998). Os animais infectados por esse sorotipo apresentam dispnéia, respiração difícil, contrações abdominais, prostração e febre alta. Animais mortos ou muito doentes podem apresentar coloração arroxeada na região abdominal sugerindo a ocorrência de choque endotóxico (PIJOAN, 1999).

Já a forma subaguda está associada com amostras que produzem pleurite. Nesse caso, tosse e respiração abdominal podem ser observadas em animais na fase de crescimento e terminação. Clinicamente, a doença pode ser confundida com a pleuropneumonia causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porém geralmente não ocorre morte súbita.

A forma crônica é a mais comum e se caracteriza por tosse ocasional, comumente entre 10 a 16 semanas de idade. Os sinais são indistinguíveis daqueles causados pela infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* sendo que a *P. multocida* representa uma continuação da exarcebação da micoplasmose primária.

As lesões microscópicas são similares à da maioria das pneumonias bacterianas, com broncopneumonia, hiperplasia alveolar e presença de muitos neutrófilos com exudato mucopurulento no lúmen bronquial e espaço alveolar.

O diagnóstico é baseado no isolamento do agente ou na realização de testes para demonstração da sua presença ou seus antígenos, como sorologia e provas moleculares (PIJOAN, 1999).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

A *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).

A família *Pasteurellaceae* compreende cinco gêneros: *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Pasteurella* e *Lonepinella*. Esses gêneros compartilham várias características, e alguns microorganismos tem sido reclassificados dentro desses gêneros após estudos de hibridização de ácido desoxirribonucléico e sequenciamento de RNAr 16S. *Pasteurella aerogenes*, *P. trehalosi* e *P. pneumotropica* são mais estreitamente relacionadas aos membros do gênero *Actinobacillus* do que a outras espécies de *Pasteurella* (MUTTERS et al., 1985). *Pasteurella trehalosi* é agora usada para designar isolados de *Pasteurella haemolytica* tipo T, enquanto isolados de *Pasteurella haemolytica* biótipo A tem sido distribuídas em novo gênero e renomeadas como *Mannheimia haemolytica* (SNEATH E STEVENS, 1990; ANGEL et al., 1999).

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).

A *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 e gatos, 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, catalase e oxidase

positivas e urease negativa. 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).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

2.3.1 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). A toxina é termolábil, dermonecrótica em cobaio e letal para camundongos quando administrada pela via intraperitoneal (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 (CHANTER, 1990).

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 (CHANTER, 1990).

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).

2.3.2 Proteínas externas de membrana (OMPs)

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*.

2.3.3 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 glicolipídeos. 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).

2.3.4 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; BOROWISKI, 2001).

O papel das fímbrias na virulência de diversas espécies é amplamente documentado. O isolamento de amostras fimbriadas de *P. multocida* tipo A e tipo D tem sido descritas por diferentes autores em aves, suínos e coelhos (GLORIOSO et al., 1982; TRIGO; PIJOAN, 1988; PIFFER; CASTRO, 1993). No entanto, maiores estudos sobre este tema têm sido dificultados pela influência de diferentes fatores tais como temperatura de incubação, repetidos sub-cultivos e meios de cultura utilizados na expressão in vitro das fímbrias (GLORIOSO et al., 1982).

2.3.5 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 polianiónicos 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).

Mutantes acapsulares de uma série de microrganismos apresentam virulência reduzida (BOYCE et al., 2000). 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).

2.4 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, padrão de fermentação de carboidratos, e propriedades sorológicas. No entanto, condições relativas ao cultivo

do agente podem influenciar a 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).

2.4.1 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 até o momento duas metodologias utilizando a PCR. Kasten et al. (1997), descrevem 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 uma PCR baseada na amplificação de uma seqüência denominada KMT1 específica para o agente e identificada através de hibridização subtrativa.

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).

3 OBJETIVOS

Caracterizar os isolados de *P. multocida* provenientes de suínos de acordo com o tipo capsular, produção de toxina dermonecrótica e os genes codificadores de possíveis fatores de virulência, através da reação em cadeia pela polimerase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bacteriológico

Foram analisadas 123 amostras de *Pasteurella multocida* provenientes de suínos e pertencentes à coleção do laboratório de Sanidade Suína – VPS - FMVZ-USP. As cepas identificadas como *P. multocida* estocadas a -75° C foram semeadas em caldo BHI e Agar sangue de carneiro, colônias isoladas foram utilizadas para extração de DNA e realização da PCR.

4.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS

4.2.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano a partir das colônias selecionadas foi realizada segundo o método descrito por Boom et al.(1990) descrito a seguir:

A um microtubo de 1,5 ml contendo 200 µl de cultura bacteriana, foi adicionado 1 ml do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100X 1ml, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 111,2 ml, EDTA 0,5M 8,8 ml) e 40 µl da suspensão carreadora (1gr Terra diatomácea, HCl 50 µl e 5 ml água ultrapura). O microtubo foi agitado por 1 minuto e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 90 segundos a 10.000 g. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1 ml do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 100ml). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona. Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37° C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foi

adicionado 100µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo, este foi agitado por 1 minuto e mantido à 56 °C por 10 minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 10.000g, o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20° C até sua utilização.

4.2.2 Amplificação do DNA

A PCR para detecção dos diferentes genes selecionados foi realizada em microplacas de 96 cavidades. Para tanto uma alíquota de 5 µl de DNA de cada cepa foi adicionada na cavidade correspondente, seguindo o desenho pré determinado para cada ensaio. Para cada grupo de genes foi utilizada uma microplaca de PCR contendo até 92 amostras de DNA das cepas testadas e 2 controles positivos (DNA bacteriano) e 2 controles negativos (água milliQ®).

A mistura para PCR continha 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles dos *primers* específicos para cada gene pesquisado (quadros 1 e 2), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl .

Sorogrupo	Gene	Nome	Sequencia (5'-3')	Amplicon (pb)
Todos	KMT1	KMT1T7 KMT1SP6	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460
A	<i>HyaD-hyaC</i>	CAPA-FWD CAPA-REV	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1.044
B	<i>BcbD</i>	CAPB-FWD CAPB-VER	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCCGAGAGTTTCAATCC	760
D	<i>DcbF</i>	CAPD-FWD CAPD-VER	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657
E	<i>EcbJ</i>	CAPE-FWD CAPE-VER	TCCGCAGAAAATTATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTG	511
F	<i>fcvD</i>	CAPF-FWD CAPF-VER	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851

Townsend et al. (1998)

Quadro 1 - Sequência de *primers* utilizados na Multiplex PCR para tipagem capsular de *P. multocida*

(Continua)

Primer	Sequência do primer (5'-3')	Gene	Referencia
P6 s	TCTGGATCCATGAAAAAACTAACTAAAGTA	<i>psl</i>	Kasten et al. (1997)
P6 as	AAGGATCCTTAGTATGTCAACACAGGACGACG		
Pm 1 A	GGTCAGATGATGCTACATACTCC	<i>toxA</i>	Kamp et al, 1996
Pm 1 B	CCAAACAGGGTTATATTCTGGAC		
Pm 3 A	CAAGTCTTAATCCTCCACAAGG		
Pm 3 B	GGGCTTACTGAATCACAAGAGCC		
OmpH s	CGCGTATGAAGGTTAGGT	<i>ompH</i>	Ewers et al, (2006)
OmpH as	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC		
Oma87s	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC	<i>oma87</i>	Ewers et al, (2006)
Oma87-1 as	TGACTTGCGCAGTTGCATAAC		
Fim4 s	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	<i>ptfA</i>	Doughty et al. (2000)
Fim4 as	TCATGAATTCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG		
TbPA s	TTGGTTGGAAACCGTAAAAGC	<i>tbPA</i>	Ewers et al, (2006)
TbPA as	TAACGTGTACGCAAAAGCCC		
TbPA1 as	TGCGACAACGGAAATTTCTC	<i>tbpA</i>	Ogunnariwo et al, (2001)
TbPA1 s	CGACAGTGCATATAACTTGTCTTACTA		
NanB1 s	GTCCTATAAAGTGACGCCGA	<i>nanB</i>	Ewers et al, (2006)
NanB1 as	ACAGCAAAGGAAGACTGTCC		
NanH1 s	GAATATTTGGGCGGCAACA	<i>nanH</i>	Ewers et al, (2006)
NanH1 as	TTCTCGCCCTGTCATCACT		

Quadro 2 - Sequência dos primers dos genes de virulência que foram pesquisados

(Conclusão)

Primer	Seqüência do primer (5'-3')	Gene	Referencia
ExbB s	GGTGGTGATATTGATGCGGC	<i>exbBD</i> <i>tonB</i>	Ewers et al, (2006)
TonB as	GCATCATGCGTGACGGTT		
SodA s	TACCAGAATTAGGCTACGC	<i>sodA</i>	Ewers et al, (2006)
SodA as	GAAACGGGTTGCTGCCGCT		
SodC s	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA	<i>sodC</i>	Lainson et al. (1996) e Ewers et al, (2006)
SodC as	TGGTGCGGGTGATCATCATG		
Pfha1 s	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	<i>pfhA</i>	Ewers et al, (2006)
Pfha1 as	TGGTACATTGGTGAATGCTG		
HgbA s	TGGCGGATAGTCATCAAG	<i>hghA</i>	Ewers et al, (2006)
HgbA as	CCAAAGAACCACTACCCA		
HgbB s	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	<i>hgbB</i>	Ewers et al, (2006)
HgbB as	CATTGAGTACGGCTTGACAT		

Quadro 2 - Seqüência dos primers dos genes de virulência que foram pesquisados

4.3 DETECÇÃO DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO (AMPLICON)

A detecção dos produtos de amplificação (10µl produto e 1 µl do corante Blue Green- LGC Biotecnologia) 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). Após a corrida o gel foi fotografado através do Sistema “Image Master” (GE Healthcare). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de pares de bases 100 bp DNA Ladder (LGC biotecnologia).

5 RESULTADOS

Foi realizada a padronização da PCR para detecção de *Pasteurella multocida*, determinação do tipo capsular (Figura 1), e detecção do gene codificador da toxina dermonecrótica (Figura 2).

Figura 1 - Primers descritos por Townsend et al. (2001) - Coluna 1- Amostra de *P. multocida* tipo D, Coluna 2- *P. multocida* tipo A, Coluna 3- *P. multocida* tipo D toxigênica e Coluna 4- marcador de pares de base 100 bp

Figura 2 - Linha A (primers descritos por Kamp et al, 1996) - Coluna 1 – Amostra padrão positivo - concentração inicial, Coluna 2-diluição 1×10^{-1} , Coluna 3- 1×10^{-2} , Coluna 4- 1×10^{-3} , Coluna 5- 1×10^{-4} , Coluna 6- 1×10^{-5} , Coluna 7 a 11- 10^{-6} a 10^{-10} , coluna 12 amostra negativa; coluna 13 marcador de peso molecular 100 bp

As 123 amostras foram confirmadas como *P. multocida* através da PCR para gênero e espécie e em seguida classificadas quanto ao tipo capsular. Após esta caracterização inicial foi realizada a pesquisa do gene codificador da toxina dermonecrótica e dos possíveis fatores de virulência descritos até o momento para este agente.

Em relação ao tipo capsular, foram caracterizadas 97 amostras pertencentes ao sorotipo capsular A e 26 pertencentes ao sorotipo capsular D. Todas as 123 amostras foram negativas para presença do gene codificador de toxina dermonecrótica através da PCR.

Foram avaliados 14 genes codificadores de possíveis fatores de virulência, sendo o resultado apresentado na tabela 1:

Tabela 1- Frequência dos genes de virulência em cepas de *P. multocida* isoladas de suínos

Gene	Fator codificado	Nº pos.	% positivos
<i>nanB</i>	Gene relacionado a colonização	115	93,5
<i>PSL</i>	Porina	114	92,7
<i>oma87</i>	Proteína externa de membrana	113	91,9
<i>nanH</i>	Neuraminidase	113	91,9
<i>sodA</i>	Superoxido desmutase	108	87,8
<i>hghA</i>	Proteínas ligadoras de hemoglobina	107	87,0
<i>ompH</i>	Porina	103	83,7
<i>sodC</i>	Superoxido desmutase	102	82,9
<i>PtfA</i>	Sub-unidade de fimbria tipo 4	98	79,7
<i>exbBD</i>	Transporte de proteínas ligadoras de transferrina	98	79,7
<i>tonB</i>			
<i>hgbB</i>	Proteínas ligadoras de hemoglobina	90	73,2
<i>pfhA</i>	Hemaglutinina filamentosa	18	14,6
<i>tbpA</i>	Proteína ligadora de transferrina	6	4,9

6 DISCUSSÃO

A infecção por *P. multocida* é uma importante causa de prejuízos na suinocultura do Brasil e do mundo. Estes prejuízos estão relacionados à mortalidade, ao retardo no crescimento e ganho de peso, às condenações de carcaças em abatedouros e a gastos com medicamentos, vacinas e assistência veterinária (MORENO, 2002).

O presente estudo propôs a caracterização através da reação em cadeia da polimerase (PCR) de 123 amostras de *P. multocida* subsp. *multocida* isoladas de suínos provenientes da bacterioteca do laboratório e Sanidade Suína e Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os resultados obtidos a partir desta caracterização serão discutidos a seguir.

Das 123 amostras avaliadas, 97 apresentaram o tipo capsular A (78,8%) e 26 amostras apresentaram o tipo capsular D (21%), este dado é similar ao observado por Pijoan (1998) que descreve uma freqüência maior de isolados tipo capsular A, de 62,5% e de 37,5% para o tipo capsular D.

No presente estudo não foram observadas cepas positivas para toxina dermonecrótica. Nos últimos anos a freqüência de isolamento de *P. multocida* toxigênica têm se reduzido em diferentes países, provavelmente pelo uso intensivo de antimicrobianos e vacinas contra rinite atrófica contendo a toxoide da toxina dermonecrótica nas criações de suínos comerciais.

Pullinger et al. (2004) descrevem ainda, que o gene codificador da toxina dermonecrótica produzida pela *Pasteurella multocida* na verdade não seria proveniente do cromossomo bacteriano, mas sim de um bacteriófago lisogênico que infecta o agente. A perda deste bacteriófago durante os repiques poderia ser também um fator que vem reduzindo a detecção do gene codificador desta toxina em cepas de *P. multocida*.

Os genes codificadores de diferentes fatores de virulência ou colonização pesquisados estiveram presentes nas amostras testadas, sendo detectados em maiores ou menores freqüências. Nenhum dos genes pesquisados esteve presente

em 100% dos isolados como descrito em alguns fatores por Ewers et al. (2006). Estes autores descreveram alguns dos primers usados neste estudo para detecção dos genes codificadores destas proteínas e pesquisaram sua presença em 259 isolados provenientes de diferentes espécies animais, entre elas bovinos, búfalos, pequenos ruminantes, suínos, aves, coelhos, cães, gatos e outros.

Tang et al. (2009), descrevem a caracterização de 233 isolados de *P. multocida* provenientes de suínos através da pesquisa de um conjunto de 18 genes codificadores de fatores de virulência, sendo nove abordados no presente estudo e nove não pesquisados.

No quadro 3 são comparados os resultados obtidos por Ewers et al. (2006) e Tang et al. (2009) e os obtidos no presente estudo.

Gene	% positivos		
	Presente estudo	Ewers et al, 2006	Tang et al, 2009
<i>nanB</i>	93,5	100	81,5
<i>PSL</i>	92,7	100	NT
<i>Oma87</i>	91,9	100	94,4
<i>nanH</i>	91,9	98,1	97
<i>sodA</i>	87,8	100	NT
<i>hghA</i>	87,0	98,1	96,6
<i>ompH</i>	83,7	100	93,1
<i>sodC</i>	82,9	100	NT
<i>ptfA</i>	79,7	100	93,6
<i>exbBD tonB</i>	79,7	100	97,9
<i>hgbB</i>	73,2	86,5	NT
<i>pfhA</i>	14,6	21,2	15
<i>tbpA</i>	4,9	0	0

Quadro 3 - Frequência de genes codificadores de fatores de virulência de *P. multocida* no presente estudo em comparação aos resultados descritos por Ewers et al (2006) e Tang et al (2009).

Em relação aos achados descritos por Ewers et al. (2006) em 52 amostras provenientes de suínos e Tang et al. (2009) verificaram-se algumas diferenças que se referem principalmente a menor % de isolados positivos para alguns genes. No

entanto, nos três estudos verifica-se uma menor frequência do gene codificador da hemaglutinina filamentosa (*pfhA*) em relação aos outros fatores. No presente estudo foi observada uma frequência superior do gene *tbpA*, que codifica a proteína ligadora de transferrina.

Este último fator (proteína ligadora de transferrina) tem sido associado a cepas isoladas de pequenos e grandes ruminantes, sugerindo que pode estar havendo transmissão de cepas de *P. multocida* entre suínos, bovinos e pequenos ruminantes em nosso país.

De modo geral estes fatores de virulência descritos em *P. multocida* facilitam a colonização, e invasão do organismo hospedeiro, a fuga ou desorganização da resposta imune, a lesão tecidual e/ou estimulação da resposta inflamatória a infecção. Muitos dos fatores conhecidos têm sido relacionados à espécie animal, ao sorotipo capsular ou ao quadro clínico causado, como é o caso da toxina dermonecrótica e a rinite atrófica dos suínos.

O presente estudo é o primeiro no Brasil a caracterizar cepas de *P. multocida* provenientes de suínos quanto a presença dos genes *nanB*, *psl*, *oma87*, *nanH*, *sodA*, *hghA*, *ompH*, *sodC*, *ptfA*, *exbBD* *tonB*, *hgbB*, *pfhA* e *tbpA*.

Esta linha de pesquisa será continuada através da inclusão de um número maior de isolados e pesquisa de novos fatores de virulência recentemente descritos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se:

As amostras foram caracterizadas como tipo capsular A (78,8 %) e tipo capsular D (21%), similar ao encontrado por Pijoan (1998).

Não foram encontradas cepas contendo a toxina dermonecrótica.

Os genes codificadores de diferentes fatores de virulência estiveram presentes nas amostras testadas, sendo detectados em maiores ou menores freqüências porém nenhum fator chegou a estar presente em 100% das amostras.

REFERÊNCIAS

- ABIPECS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **Carne Suína Brasileira em 2008**. Disponível em <www.abipecs.org.br>. Acesso em: 04 out. 2009.
- ANGEN, O.; MUTTERS, R.; CAUGANT, D. A.; OLSEN, J. E.; BISGARD, M. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Manheimia haemolytica* gen. nov., comb. Nov., *Manheimia granulomatosis* comb. Nov., *Manheimia glucosida* sp. nov., *Manheimia ruminalis* sp. Nov. and *Manheimia varigena* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 67-86, 1999.
- 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.
- BISGARD, M. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralblatt für Bakteriologie*, v. 279, p. 7-26, 1993.
- BISGARD, 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.
- 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. 190 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- BOROWSKY, S. M.; BARCELLOS, D.; MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J. *Rinite Atrófica*. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p. 187-196.
- 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.

CHANTER, N. Advances in atrophic rhinitis and toxigenic *Pasteurella multocida* research. **Pig News and Information**, v. 33, p. 503-506, 1990.

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

DE JONG, M. F. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. 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.

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

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

DONNIO, P. Y.; LE GOFF, C.; AVRIL, J. L.; POUEDRAS, P.; GRAS-ROUZET, S. *Pasteurella multocida*: oropharyngeal carriage and antibody response in breeders. **Veterinary Research**, v. 25, p. 8-15, 1994.

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.

EWERS, C.; LUBKE-BECKER, A.; WIELER, L. H. *Pasteurella*: insights into the virulence determinants of a heterogeneous bacterium. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, v. 117, n. 9-10, p. 367-386, 2004.

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

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

GAMAGE, L. N. A.; WIJewardana, T. G.; BASTIANSZ, H. L. G.; VIPULASIRI, A. A. An outbreak of acute pasteurellosis in swine caused by serotype B:2 in Sri Lanka. **Sri Lanka Veterinary Journal**, v. 42, p. 15-19, 1995.

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.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of cromossomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 14, p. 595-600, 1993.

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.

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.

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.

KICH, J. D.; PONTES, A. Análise da situação atual das doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. v. 1, p. 58-67.

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.

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.

MATSUMOTO, M.; STRAIN, J. G. Pathogenicity of *Pasteurella multocida*: its variable nature demonstrated by in vivo passages. **Avian Diseases**, v. 37, p. 781-785, 1993.

MORENO, A. M. **Caracterização fenotípica e genotípica e isolados de *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* de suínos provenientes de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 78 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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.

MUTTERS, R.; IHM, P.; POHL, S.; FREDERIKSEN, W.; MANNHEIM, W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevison 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology with proposal for the new species *P. 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.

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

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. Lauzanne, **Proceeding...** 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. Pneumonic pasteurellosis In: LEMAN, A. D.; STRAW, B.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Ed.). **Diseases of swine**. 7. ed. Ames: Iowa University Press, 1992. p. 552-559.

PIJOAN, C. Pneumonic pasteurellosis 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.

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.; TORREMORELL, M.; AMIGOT, J. A. **Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs.** **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 169–173, 1998.

PULLINGER, D. G.; BEVIR, 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.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, p. 67-75, 1984.

SNEATH, P. H. A.; STEVENS, M. *Actinobacillus rossi* sp. Nov., *Actinobacillus seninis* sp. Nov., rev., *Pasteurella bettii* sp. Nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. Nov., *Pasteurella mairi* sp. Nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 148-153, 1990.

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.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. Rinite Atrófica In: **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p 187.

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 Clinical Microbiology**, v 47, p. 951-958, 2009.

TOWSEND, K. M.; BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39. p. 924-929, 2001.

TOWSEND, 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.

VERMA, N. D. *Pasteurella multocida* B:2 in haemorrhagic septicaemia outbreak in pigs in India. **Veterinary Record**, v. 123, p. 63, 1998.

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.