UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAMILA APARECIDA DA CRUZ REIS

**Caracterização genética e perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de
Pasteurella multocida oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com
gingivite**

Pirassununga

2019

CAMILA APARECIDA DA CRUZ REIS

Caracterização genética e perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência.

Área de concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof^ª. Dra. Valéria Maria Lara Carregaro

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R375c Reis, Camila Aparecida da Cruz
Caracterização genética e perfil de sensibilidade
a antimicrobianos de isolados de *Pasteurella*
multocida oriundos da cavidade bucal de gatos
doméstico / Camila Aparecida da Cruz Reis ;
orientadora Valéria Maria Lara Carregaro. --
Pirassununga, 2019.
54 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. *Pasteurella multocida*. 2. Gatos. 3.
Gengivite. 4. Fatores de virulência. 5.
Antimicrobianos. I. Carregaro, Valéria Maria Lara,
orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e minha irmã, pelo esforço
diário, ao amor a mim dedicado e por estarem
sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Valéria Maria Lara Carregaro. Obrigada pela oportunidade, pela paciência, por transmitir seus conhecimentos e pelo incansável e permanente encorajamento durante todo o projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrosio e à Prof.^a Dra. Mariza Pires de Melo por terem cedido os laboratórios para a realização das análises.

À Dra. Silvana Marina Piccolli Pugini por todo conhecimento e apoio transmitidos durante a realização do projeto.

À Prof. Dra. Keila Zaniboni Siqueira Batista por gentilmente ter me acolhido na Universidade Regional de Blumenau (FURB) e por todo conhecimento transmitido.

À Mariel Dalmedico Policano e à Lygia Bittencourt Figueiredo por toda ajuda durante as etapas do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA Pirassununga/SP e ao Programa de Biociência Animal, pela estrutura oferecida, a todos os professores pelos ensinamentos ministrados nas disciplinas, e a todos os funcionários que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais e minha irmã, por toda felicidade, carinho, compreensão, apoio, incentivo e dedicação.

E para todas as pessoas, que de algum modo são importantes e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

REIS, C. A. C. 2019. Caracterização genética e perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com gengivite. 53 p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Pasteurella multocida é um agente zoonótico encontrado frequentemente na cavidade bucal de gatos domésticos. Em anos recentes, tornou-se um patógeno emergente de grande importância em saúde pública e possivelmente esteja relacionada a casos de gengivite felina. Nesse contexto, o presente trabalho teve a finalidade de caracterizar isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com gengivite. Além disso, investigou-se a presença de 14 genes relacionados a fatores de virulência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana em 48 isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal desses gatos. Os resultados mostraram que *P. multocida* foi encontrada frequentemente em amostras da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com gengivite. Em adição, o tipo capsular A foi determinado em 100% dos isolados investigados e os principais genes relacionados aos fatores de virulência nesses isolados foram *ompH*, *oma87*, *nanB*, *nanH*, *exxB/tonB* e *hgbB*. O perfil de sensibilidade antimicrobiano mostrou que a maioria dos isolados de *P. multocida* foi sensível a enrofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, neomicina e canamicina. Altas taxas de resistência bacteriana foram observadas frente ao cloranfenicol, doxiciclina e a tetraciclina. Por fim, o presente estudo criou um banco de 48 isolados de *P. multocida* devidamente caracterizados, que nos permitirão realizar novos experimentos, principalmente abordando aspectos relacionados à imunologia e a patogenicidade.

Palavras-chave: bucal; gatos domésticos; gengivite; saúde pública, *Pasteurella multocida*; fatores de virulência; antimicrobianos.

ABSTRACT

REIS, C.A.C. 2019. Genetic characterization and antimicrobial sensitivity profile of *Pasteurella multocida* isolates derived from healthy and with gingivitis oral cavity of domestic cats. 53 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Pasteurella multocida is a zoonotic agent frequently found in the oral cavity of domestic cats. Over the last few years, it has become an emergent pathogen of great importance in public health and it may be related to clinical diagnosis of feline gingivitis. In this context, the following work was aimed to characterize *P. multocida* isolates derived from healthy and with gingivitis oral cavity of domestic cats. Besides that, we investigated the presence of 14 genes related to virulence factors and the antimicrobial sensitivity profile in 48 *P. multocida* isolates derived from the oral cavity of these cats. The results showed that *P. multocida* was frequently found in oral samples derived from healthy and with gingivitis oral cavity of domestic cats. In addition, capsular type A was determined to be in 100% of the analyzed isolates and the main genes related to virulence factors in these isolates were *ompH*, *oma87*, *nanB*, *nanH*, *exbB/tonB*, and *hgbB*. The antimicrobial sensitivity profile showed that most of the isolates of *P. multocida* were sensitive to enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, gentamicin, neomycin e kanamycin. High rates of bacterial resistance were observed against chloramphenicol, doxycycline, and tetracycline. Lastly, the present study created a bank of 48 *P. multocida* isolates properly characterized that will allow us to perform new assays, mostly regarding aspects related to immunology and pathogenicity.

Keywords: oral; domestic cats; gingivitis; public health, *Pasteurella multocida*; virulence factors; antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Organização dos genes responsável pela biossíntese da cápsula dos cinco diferentes sorogrupos capsulares de <i>P. multocida</i>	19
Figura 2 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram negativas	21
Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para detecção dos fatores de virulência de isolados de <i>P. multocida</i> oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos	29
Tabela 2 - Diâmetro dos halos de inibição dos antibióticos utilizados para o teste disco-difusão em ágar	30
Tabela 3 - Frequência dos fatores de virulência dos isolados de <i>P. multocida</i> oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos	32
Tabela 4 - Frequência dos fatores de virulência dos isolados de <i>P. multocida</i> oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.....	33
Tabela 5 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de <i>P. multocida</i> oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos	34
Tabela 6 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de <i>P. multocida</i> oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. GERAL	15
2.2. ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. <i>Pasteurella multocida</i>	16
3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA	18
3.2.1 Cápsula	18
3.2.2 Lipopolissacarídeo (LPS)	21
3.2.3 Toxina Dermonecrótica	22
3.2.4 Proteína externa da membrana (omp)	22
3.2.5 Fímbrias e Adesinas	23
3.2.6 Neuraminidases	23
3.2.7 Superóxido dismutase (SOD)	24
3.2.8 Proteínas ligadas a aquisição e regulação de ferro	24
3.3 Terapia antimicrobiana para <i>Pasteurella multocida</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. ANIMAIS	26
4.2. AMOSTRAS	27
4.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	27
4.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	27
4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA	28
4.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	30
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5. RESULTADOS	32

6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A população mundial de gatos domésticos vem aumentando nos últimos anos como mostram os dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET). Somente no Brasil, estima-se que a população de felinos seja em torno de 22 milhões (ABINPET, 2018). Consequentemente, há uma demanda maior em determinar as principais causas de atendimentos clínicos a felinos na rotina médica veterinária.

Entre as enfermidades comuns em gatos domésticos, destaca-se as afecções bucais, que acometem animais de diferentes raças e faixas etárias. Em um estudo realizado na França com 109 gatos saudáveis com idade de $6,2 \pm 5,2$ anos, 96% apresentaram algum grau de doença periodontal (GIRARD et al., 2009). Na Finlândia, as afecções bucais e dentais foram as mais prevalentes entre os 5.415 animais de diversas raças e faixas etárias atendidos com a taxa de prevalência de 28% (VAPALAHTI et al., 2016). Esse cenário também se repetiu na Inglaterra, em que a doença periodontal foi a mais prevalente entre 3.584 (13,9%) nos atendimentos clínicos (O'NEILL et al., 2014).

A etiopatogenia dessas afecções bucais ainda não foi totalmente estabelecida. Entretanto, acredita-se que estejam envolvidos vários fatores, dos quais se destacam as infecções bacterianas. Adicionalmente, o desequilíbrio da microbiota bucal é apontado com uma das possíveis causas para ocorrência da gengivite felina.

A microbiota bucal dos gatos é constituída por vários agentes bacterianos, virais e fúngicos. Muitos desses microrganismos são comensais e possuem baixo poder de virulência e patogenicidade. Entretanto, outros são patogênicos e estão associados a casos graves de enfermidades em diferentes espécies animais, inclusive os seres humanos. Estudos diversos têm buscado determinar os diferentes gêneros bacterianos predominantes em amostras bucais de gatos. Os principais gêneros identificados são *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Treponema* spp., *Kingella* spp., *Porphyromonas* spp., *Capnocytophaga* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., entre outros. Contudo, determinar quais agentes infecciosos estão envolvidos nesse processo patogênico bucal é um desafio, pois a maioria das bactérias identificadas na cavidade bucal é encontrada tanto em animais saudáveis, como em gatos com gengivite, o que torna a identificação de fatores bacterianos de virulência da microbiota bucal importante e necessária para melhor compreensão da etiopatogenia das afecções bucais.

Apesar da grande diversidade encontrada na microbiota bucal de felinos, a *Pasteurella multocida* tem se destacado por sua associação recente como um dos possíveis agentes

bacterianos envolvidos na etiopatogenia da gengivite felina e por sua importância em saúde pública. Sua prevalência em amostras bucais de gatos é alta, com taxas que variam entre 70 a 90%. Em humanos, as infecções locais, como celulite, são relatadas comumente pós-traumatismo ocasionado por mordedura e arranhadura de felinos. Entretanto, casos graves de infecções generalizadas e sistêmicas podem ocorrer, principalmente em pessoas imunocomprometidas. Deve-se ressaltar que a transmissão da *P. multocida* para humanos pode ocorrer também pela lambedura ou mesmo pelo contato direto e prolongado com gatos domésticos de estimação. Em gatos, *P. multocida* tem sido também associada a abscessos subcutâneos e a piotorax, além de ser considerada um patógeno secundário em infecções respiratórias associadas ao complexo respiratório felino.

Desde a década de 50, o fármaco de escolha para o tratamento de infecções por *Pasteurella* tem sido o grupo das penicilinas, apesar da maioria das bactérias Gram-negativas não serem sensíveis a elas. Na atualidade, poucos estudos objetivaram determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *P. multocida* isoladas de gatos domésticos oriundas de animais sadios ou não. Porém, já se sabe que cepas bacterianas multirresistentes têm sido isoladas frequentemente em pequenos animais. Esses achados se tornam importantes uma vez que tem aumentado a população de gatos domésticos e o contato entre estes animais e os humanos, possibilitando a transmissão cruzada dessas bactérias. Ademais, os estudos de determinação de sensibilidade a antimicrobianos são importantes para direcionar a escolha do tratamento clínico quando não há possibilidade de realizar a cultura bacteriológica e antibiograma na rotina clínica.

Após o exposto, visto a importância que esse patógeno bacteriano apresenta junto a rotina clínica médica veterinária e sua implicação em saúde pública, o presente trabalho teve a finalidade de isolar e caracterizar isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos. Além disso, identificar os fatores de virulência e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos desses isolados. Adicionalmente, criar um banco de isolados de *P. multocida* que permitirá no futuro próximo realizar estudos imunológicos, de patogenicidade e testes de sensibilidade a fitoterápicos.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O presente trabalho apresentou a finalidade de isolar e caracterizar amostras de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.

2.2. ESPECÍFICOS

- Isolamento e caracterização bioquímica de amostras de *Pasteurella multocida* oriundos de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- Identificação molecular de isolados de *Pasteurella multocida* oriundas da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- Determinação de fatores de virulência de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- Determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- Criação de um banco de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A cavidade bucal de gatos contém uma população bacteriana rica e diversificada e pelo menos já foram identificadas aproximadamente 500 espécies bacterianas (DOLIESLAGER et al. 2011). As bactérias comumente isoladas em amostras da microbiota bucal de gatos incluem *Pasteurella multocida*, *Pasteurella pneumotropica*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Moraxella* e *Neisseria* (DOLIESLAGER et al. 2011; DOLIESLAGER et al., 2013; HARIHARAN et al. 2010; STURGEON et al. 2014; WHYTE et al. 2017).

Apesar da *P. multocida* ser considerada um membro da microbiota bucal de gatos saudáveis, a sua subespécie *P. multocida* subsp. *multocida* tem sido isolada na maioria das amostras bucais de gatos com gengivite e tem sido relacionada diretamente com a afecção (DOLIESLAGER et al. 2011). Além da *P. multocida* subsp. *multocida*, as bactérias *P. multocida* subsp. *septica*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Pepycoccus* spp., *Porphyromonas* spp., *Capnocytophaga canimorsus* e *Fusobacterium* spp. também têm sido isoladas frequentemente de amostras da cavidade bucal de gatos com gengivite (DOLIESLAGER et al. 2011; WHYTE et al. 2017). Contudo deve-se ressaltar que a etiopatogenia da gengivite felina ainda não foi elucidada, mas acredita-se que a presença de bactérias e o desequilíbrio da microbiota bucal e da resposta imune local possam contribuir para o processo inflamatório (DIEHL; ROSYCHUCK, 1993).

Os agentes patogênicos comumente isolados de feridas provocadas por mordeduras de gatos geralmente incluem as bactérias que são isoladas da microbiota bucal desses animais, como *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Fusobacterium* spp, *Pasteurella* spp, *Moraxella* spp e *Capnocytophaga* spp (GOLDSTEIN, 1989; STURGEON et al., 2014; TALAN et al., 1999; WEESE et al., 2015). Entretanto, os estudos demonstram que dentre esses patógenos, a *Pasteurella multocida* tem grande importância em saúde pública, devido aos quadros infecciosos que provoca em seres humanos (OEHLER et al., 2009; KWO; AGARWAL; MELETIOU, 2011).

3.1. *Pasteurella multocida*

A família *Pasteurellaceae* é formada por um grupo diverso de bactérias que, nas últimas décadas, têm sofrido alterações em sua sistemática em decorrência de estudos filogenéticos, os

quais ocasionaram a realocação de vários gêneros (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2010), e tem como principal representante o gênero *Pasteurella*.

As bactérias do gênero *Pasteurella* são pequenos bacilos ou cocobacilos, Gram negativos, anaeróbias facultativas e imóveis (QUINN et al., 2005). Em geral, replicam-se em meios não enriquecidos; entretanto, apresentam melhor desenvolvimento em meios de cultura suplementados com sangue ou soro a 37° C por 24 a 48 horas. As colônias de *Pasteurella* em ágar sangue de ovino são convexas, acinzentadas e brilhantes de 0,5 a 1,5 mm de diâmetro, mas não hemolíticas e podem apresentar aspecto mucoide, devido a presença de cápsula (HOLST et al., 1992; QUINN et al., 2005). As pasteurelas não se desenvolvem em meios de cultura com sais biliares, como ágar MacConkey, com exceção da *P. aerogenes* (QUINN et al., 2005). Uma importante característica da espécie *P. multocida* em culturas recentes ou em amostras clínicas submetidas ao método de Giemsa ou de Leishman é a coloração bipolar (GLISSON et al., 2008).

Até o presente, o gênero *Pasteurella* é constituído por pelo menos 13 espécies, *P. multocida*, *P. canis*, *P. pneumotropica*, *P. aerogenes*, *P. oralis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis*, *P. langaaensis*, *P. mairii*, *P. skyensis*, *P. bettyae*, *P. testudinis* e *P. caballi* (ICSP, 2018). Deve-se ressaltar que dessas espécies de *Pasteurella* apenas nove têm sido associadas a infecções, porém somente *P. multocida*, *P. canis* e *P. pneumotropica* têm sido implicadas frequentemente a surtos clínicos (ICSP, 2018). Contudo, a espécie mais proeminente do gênero, *P. multocida*, apresenta quatro subespécies a saber: *P. multocida* subespécie *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica*, *P. multocida* subsp. *gallicida* e *P. multocida* subsp. *tigris* (WILSON; HO, 2013). A classificação da *P. multocida* em subespécies é baseada na habilidade de produzir ácidos a partir de determinados açúcares, como ducitol e sorbitol, na homologia de DNA e na atividade da enzima α -glicosidase (CHRISTENSEN et al., 2007).

A *P. multocida*, agente etiológico da pasteurelose, é considerada um patógeno oportunista do trato respiratório superior, sendo associada a infecções crônicas e agudas que podem ocasionar alta morbidade (WILSON; HO, 2013). Particularmente, em animais domésticos e silvestres, aves e coelhos, a pasteurelose ocasiona pneumonia, rinite atrófica em suínos, dermonecrose, celulite, abscessos, meningite, septicemia hemorrágica e mortalidade (ELLIOTT et al., 2005; FRESHWATER, 2008; HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; RAJKHOWA, 2015). Adicionalmente, as espécies de *Pasteurella* têm sido identificadas predominantemente em surtos epidêmicos de grande impacto econômico na criação de animais domésticos além da ocorrência em animais silvestres (WILSON; HO, 2013).

Em pequenos animais de estimação, mas principalmente em gatos, a *P. multocida* é associada a enfermidades do trato respiratório superior, conjuntivite, abscessos, osteonecrose, estomatite e a gengivite (ABRAHAMIAN; GOLDSTEIN, 2011; DOLIESLAGER et al., 2011; LIORET et al., 2013). Esse patógeno, deve-se ressaltar, pode ser transmitido para seres humanos através de mordedura, arranhaduras e lambeduras de animais domésticos, podendo ocasionar infecções leves a graves, como abscessos, peritonite, artrite séptica, endocardite e septicemia, tornando-o assim um problema de saúde pública (GUSTAVSSON et al., 2016; HEY et al., 2012; SOL; VAN DE KAR; SCHREUDER, 2013). Estudos microbiológicos de feridas por mordeduras de gatos em humanos mostraram que as espécies de *Pasteurella* estavam presentes em 75% das amostras, sendo a espécie mais frequente foi *P. multocida* (54%), seguida pela *P. dagmatis* (7%), *P. stomatis* (4%) e *P. canis* (2%) (TALAN et al., 1999).

A patogenicidade da *P. multocida* está ligada a diversos fatores de virulência, que já foram identificados por meio de estudos moleculares e estão associados às etapas de adesão, colonização e invasão do hospedeiro, tais como as adesinas, toxina dermonecrótica, proteínas de aquisição de ferro, enzimas extracelulares e proteínas da membrana externa (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; RAJKHOWA, 2015; WILSON; HO, 2013). Adicionalmente, segundo a presença da cápsula, a *P. multocida* é classificada dentro de cinco sorogrupos (RHOADES; RIMLER, 1987), em 16 sorovares (HARPER et al., 2011) e oito genótipos de acordo com o lipopolissacarídeo (LPS) (HARPER et al., 2015). Ressalta-se que a caracterização molecular baseada na detecção de diferentes fatores de virulência mostrou-se profícua para tipagem de isolados bacterianos e esses fatores são considerados importantes marcadores epidemiológicos para o reconhecimento do potencial patogênico dos isolados (GARCIA-ALVAREZ et al., 2017).

3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

3.2.1 Cápsula

Segundo diferenças dos polissacarídeos da cápsula, a *P. multocida* é classificada em cinco tipos ou sorogrupos (RIMLER; RHOADES, 1989). O sorogrupo capsular A é composto principalmente pelo ácido hialurônico, enquanto o sorogrupo B é formado pela arabinose, manose e galactose, o sorogrupo D é formado pela heparina, já o sorogrupo F tem como principal composto a condroitina e o composto principal do sorogrupo E ainda não foi elucidado

(BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000; DeANGELIS et al., 2002; DeANGELIS; WHITE, 2002; ROSNER et al., 1992).

A região genômica responsável pela biossíntese da cápsula é formada por 11 sequências abertas de leitura (ORF, *Open Reading Frame*), divididas em três regiões (TOWNSEND et al., 2001), e nove destas ORFs já tiveram suas funções determinadas (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). As proteínas codificadas pelos quatro primeiros genes (*hexABCD*) são responsáveis pelo transporte de polissacarídeos capsulares para superfície (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). Enquanto, os cinco genes seguintes (*hyaABCD*) estão associados a formação de monômeros capsulares de açúcares e na montagem do polissacarídeo da cápsula do sorogrupo A.

Os genes *hyaA* e *hyaD* estão envolvidos na montagem direta do polissacarídeo, uma vez que as proteínas codificadas por estes genes são responsáveis pela adição de açúcares na cadeia do polissacarídeo capsular. O gene *hyaC* é um catalisador enzimático, que transforma UDP-glicose em UDP-glicurônico, sendo considerado precursor da cápsula bacteriana. As funções dos genes *hyaB* e *hyaE* ainda não foram elucidadas (CHUNG; ZHANG; ADLER, 1998). Os dois últimos genes, *phyA* e *phyB*, estão associados à substituição de fosfolipídios do ácido hialurônico antes da translocação (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). A figura 1 apresenta a organização genômica da região responsável pela biossíntese da cápsula da *P. multocida*.

Figura 1 - Organização dos genes responsável pela biossíntese da cápsula dos cinco diferentes sorogrupos capsulares de *P. multocida*

Organização genética dos locos biossintéticos da cápsula de isolados representativos dos sorogrupos A, D, F, B e E. de *P. multocida*. As sequências apresentadas foram determinadas a partir das estirpes X - 73 (A), P934 (D), P4218 (F), M1404 (B) e P1234 (E). Caixas acima das linhas indicam genes transcritos da esquerda para a direita, enquanto caixas abaixo das linhas representam os genes transcritos da direita para a esquerda. As caixas pontilhadas indicam genes que não tiveram as suas sequências completamente determinadas, mas foram demonstradas por PCR. Os nomes dos genes são mostrados acima ou abaixo das caixas correspondentes. Setas pequenas (sem escala) indicam as posições dos primers usados para tipagem capsular por PCR (TOWNSEND et al. 2001). As setas em ângulo reto entre *phyA* e *hyaE* no diagrama capsular A, indicam a posição dos dois promotores de locus capsular previstos. O agrupamento de genes em regiões associadas ao transporte, biossíntese ou lipidação é mostrado acima do diagrama do tipo A (para os sorotipos A, D e F) e acima do diagrama do tipo B (para os sorotipos B e E). Genes que codificam proteínas com > 50% de identidade são sombreados de forma idêntica. Números abaixo ou acima da caixa indicam as distâncias entre os genes em pares de base (pb). Fonte: BOYCE et al. 2010.

A sequência nucleotídica responsável pela biossíntese da cápsula do sorogrupo B é formada por 15 ORFs, das quais apenas em sete já tiveram suas funções identificadas. Os primeiros quatro genes, *cexABCD*, possuem a mesma função supracitada para os genes *hexABCD*. Os genes *bcbABCDEFGHI* são responsáveis pela formação dos monômeros do polissacarídeo capsular. A comparação genômica entre as cepas padrões de *P. multocida* dos sorogrupos A e B mostra uma alta similaridade funcional entre elas (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000).

Embora não seja completamente elucidado, acredita-se que determinados sorogrupos capsulares de *P. multocida* sejam restritos a uma determinada espécie animal e estão associados a patogenicidade (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006, 2012). Neste contexto, sabe-se que a cólera aviária é causada principalmente pelo sorogrupo A (ASKI; TABATABAEI, 2016) e as vezes pelo sorogrupo D (RIMLER, RHOADES, 1989). Em suínos, os sorogrupos A e D estão associados a ocorrência da rinite atrófica e à pneumonia (CHANTER; GOODWIN; RUTTER, 1989). Em bovinos, a pasteurelose tem sido associada a quadros de septicemia hemorrágica e pneumonia, e os principais sorogrupos envolvidos nestas enfermidades são A, B e E (CARTER, De ALWIS, 1989; FRANK, 1989). A maioria dos isolados de *P. multocida* oriundos de cães (87,5%) e gatos (66,6%) foram identificados como sorogrupo A (ASKI; TABATABAEI, 2016). Em recente estudo, 18 isolados de *P. multocida* oriundos de gatos foram caracterizados como sorogrupo A (UJVARI; MAKRAI; MAGYAR, 2019).

A cápsula hidrofílica da *P. multocida* lhe confere a capacidade de inibir a fagocitose e opsonização mediada pelo complemento, resistência à dessecação e maior aderência a determinados tipos celulares (BORRATHYBAY et al., 2003; BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). Deve-se ressaltar que este é o fator de virulência da *P. multocida* mais estudado. Em geral, as cepas de *P. multocida* com cápsula são mais virulentas que os isolados acapsulados (CHUNG et al., 2001).

3.2.2 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS, assim como a cápsula, apresenta importante papel na virulência. As cepas de *P. multocida* são classificadas em 16 sorotipos diferentes a partir da composição dos antígenos somáticos de LPS (HEDDLESTON; GALLAGHER; REBERS, 1972) e em oito genótipos (HARPER et al., 2015). Em gatos, já foram identificados os genótipos L1, L3 e L7 associados ao LPS (UJVARI; MAKRAI; MAGYAR, 2019). O LPS é um importante constituinte da membrana externa das bactérias Gram negativas e é formado por três componentes típicos, como lipídeo A, oligossacarídeo central (região do core) e uma cadeia de polissacarídeo, denominado de antígeno O, como mostra a figura 2 (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Contudo, em algumas cepas de *P. multocida* não foi identificado o antígeno O (HARPER et al., 2011) e já foram demonstradas diferenças na estrutura do oligossacarídeo do núcleo (core) (HARPER et al., 2007), as quais, possivelmente, confere vantagem de sobrevivência à bactéria (BOYCE et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram negativas

Fonte: Portal eDiciplinas – USP. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/glossary/view.php?id=1672606>. Acesso em: 08 de fevereiro de 2019.

O lipídeo A, também conhecido como endotoxina, é um fosfolipídio, que estimula as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro, sendo também responsável por induzir choque endotóxico (HARPER et al., 2007). Sabe-se hoje que o lipídeo A é um padrão molecular associado a patógeno (PAMP) e que este é capaz de ser reconhecido pelos vários receptores de reconhecimento padrão de eucariotos, como os receptores *Toll-like* (TLR). Uma vez que ocorre o reconhecimento e sinalização via TLR 4, uma cascata imunológica é ativada e ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente pelos macrófagos, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (Da SILVA CORREIA et al., 2001).

Adicionalmente, também estimulam a liberação de moléculas coestimuladoras, que ativam a resposta imune adaptativa (HARPER, BOYCE, 2017).

3.2.3 Toxina Dermonecrótica

A toxina dermonecrótica (PMT – *Pasteurella multocida toxin*) é a única toxina expressa pela *P. multocida* (LAX, CHANTER, 1990; NAGAI; SOMENO; YAGIHASHI, 1994). É um potente mitógeno expresso pelos isolados do grupo capsular D e de algumas cepas pertencentes ao sorogrupo A. Ela é responsável pela rinite atrófica em suínos causando reabsorção tecidual e inibição da diferenciação de osteoblastos causada pela produção descontrolada de osteoclastos (BOYCE et al. 2010; LAX, CHANTER 1990). Deve-se ressaltar que apesar do importante papel da PMT na patogenicidade, até o presente momento, a PMT não foi identificada em nenhum isolado de *P. multocida* oriunda de amostras de gatos domésticos (ASKI; TABATABAEI, 2016; FERREIRA et al., 2015).

A PMT é liberada após a lise bacteriana e absorvida pelas células hospedeiras por endocitose por meio de ligação a um receptor de superfície celular (PETTIT; ACKERMANN; RIMLER, 1993). *In vitro*, demonstrou-se que o PMT promove a maturação de células dendríticas humanas pela ativação da via de sinalização da fosfolipase C, mas curiosamente não parece agir como um adjuvante mucoso, bloqueando ativamente a migração de células dendríticas para linfonodos regionais (BAGLEY et al. 2005; BLOCKE et al. 2006).

3.3.4 Proteína externa da membrana (omp)

Pelo menos três genes responsáveis pelas proteínas externas de membrana já foram identificados em cepas de *P. multocida* (WILSON; HO, 2013). A principal função das proteínas externas está associada a colonização dos tecidos mucoides do hospedeiro. Além disso, elas impedem a entrada de substâncias tóxicas, atuam no transporte de substâncias para dentro e fora da célula bacteriana, na absorção de nutrientes e na interação da bactéria com meio externo e o hospedeiro (HATFALUDI et al., 2010).

A proteína estrutural A (ompA) está ancorada na membrana externa e é formada por dois domínios, dos quais um está ligado ao peptidoglicano (HATFALUDI et al., 2010). Sua função primordial é estabilizar a membrana externa; entretanto, acredita-se que possa atuar como uma porina (NIKAIDO, 2003). Adicionalmente, outras funções já foram associadas a essa proteína. Um estudo demonstrou que ela pode atuar como adesina e invasina, além de estar

associada a formação de biofilme. A proteína A também pode estar relacionada a evasão do sistema imune e pode atuar como receptor para vários bacteriófagos (SMITH et al., 2007).

A proteína H (ompH) é considerada o principal componente da membrana externa da *P. multocida* (LUGTENBERG et al., 1986), cuja função está associada ao transporte de nutrientes para bactéria, ou seja, é uma porina transmembrânica (HATFALUDI et al., 2010). Essa proteína é bastante conservada geneticamente, por isso tem sido alvo de pesquisas para produção de vacinas (HATFALUDI et al., 2010). Ambas as proteínas externas, ompA e ompH, já foram identificadas em isolados de *P. multocida* oriundas de gatos domésticos (ASKI; TABATABAEI, 2016; UJVARI; MAKRAI; MAGYAR, 2019).

3.3.5 Fímbrias e Adesinas

As fímbrias conferem à bactéria a capacidade de adesão, e por isso, também são consideradas fatores de virulência, pois auxiliam na interação entre moléculas presentes na superfície do patógeno e do hospedeiro essenciais para a colonização de tecidos (BOYCE et al., 2010; MADIGAN; MARTINKO, 2010). Apesar dos vários genes codificadores de fímbrias já terem sido identificados, o gene mais estudado é o *ptfA*, o qual codifica a proteína denominada fímbria do tipo IV (DOUGHTY; RUFFOLO; ADLER, 2000; SELLYEI; BÁNYAI; MAGYAR, 2010; SIJU et al., 2007). Outro gene associado à colonização bacteriana é o *pfhA*, que é responsável pela codificação da proteína denominada hemaglutinina filamentosa. Essa proteína tem capacidade de se ligar a proteína C4BP, resultando na inibição da ativação do sistema complemento (TATUM; YERSIN; BRIGGS, 2005).

3.3.6 Neuraminidases

O ácido siálico é constituinte das células e é responsável pela estabilização de membranas e regulação da função de receptor transmembrana (VIMR et al. 2004). Ele pode ser sintetizado ou obtido a partir do hospedeiro e é incorporado na superfície capsular ou LPS do patógeno. Isso faz com que o patógeno consiga evitar o sistema imune do hospedeiro e possa circular livremente (CHRISTENSEN; BISGAARD, 1997; VIMR; LICHTENSTEIGER, 2002). Uma grande gama de bactérias possui neuraminidases e, com o auxílio delas, conseguem retirar o ácido siálico das glicoproteínas e glicolípídeos do hospedeiro e utilizá-lo como fonte de carbono e nitrogênio ou como fonte de açúcares (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; SWORDS et al. 2004; VIMR et al. 2004). Na *P. multocida*, as neuraminidases *nanB* e *nanH* são as responsáveis pela retirada do ácido siálico das glicoproteínas do hospedeiro, o que

confere uma maior capacidade metabólica para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (MIZAN et al., 2000).

3.3.7 Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que tem como função catalisar a dismutação das espécies reativas do radical ânion superóxido para peróxido de hidrogênio, que é menos reativo. A SOD é classificada de acordo com o tipo de metal ligante ou sítio ativo, podendo ser zinco, cobre, manganês ou ferro (McCORD, 2000). Como a membrana citoplasmática é impermeável às SODs não ocorre a dismutação dos superóxidos na superfície celular e no periplasma (LAINSON et al., 1996). Sendo assim, a cobre-zinco superóxido-dismutase (CuZnSOD) ou Superóxido Dismutase I (SOD I) tem sido relatada no periplasma de muitos organismos (LAINSON et al., 1996). A SOD I, codificada pelo gene *sodC*, é composta por duas subunidades idênticas, onde cada uma é composta por um íon de cobre, um íon de zinco e por uma ligação dissulfeto ((VALENTINE; DOUCETTE; POTTER, 2005). Outro gene importante é o *sodA*, que codifica a enzima manganês superóxido-dismutase (MnSOD), que é encontrada nas mitocôndrias e possui níveis de biossíntese regulados pela concentração de ferro (GAUTIER et al., 2005).

3.3.8 Proteínas ligadas a aquisição e regulação de ferro

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência das bactérias e a necessidade desse elemento e a capacidade de adquiri-lo *in vivo* têm sido descritos em várias espécies, pois ele participa de vários processos biológicos (transporte de oxigênio, regulação gênica e síntese de DNA) (KREWULAK; VOGEL, 2008; LEE et al., 1991; MADIGAN; MARTINKO, 2010). Algumas bactérias desenvolveram mecanismos para a captação de ferro, dentre esses mecanismos destacam-se a captação de ferro por meio de agentes quelantes (KREWULAK; VOGEL, 2008). Os agentes quelantes são secretados pelas bactérias com a função de remover o ferro associado às glicoproteínas do hospedeiro (HATFALUDI et al., 2010; MADIGAN; MARTINKO, 2010).

A fonte de ferro no hospedeiro são as proteínas hemoglobina e ferritina e, como o ferro está presente no interior dessas proteínas, a bactéria utiliza toxinas para lisar os eritrócitos (KREWULAK; VOGEL, 2008). As proteínas *HgbA* e *HgbB* são exemplos de proteínas da *P. multocida* que se ligam a hemoglobina (HATFALUDI et al., 2010). Quem supre a energia do metabolismo do ferro é o Complexo TonB composto pelas proteínas *TonB*, *ExbB* e *ExbD* e estão localizadas na membrana interna da *P. multocida* (KREWULAK; VOGEL, 2008).

3.3 Terapia antimicrobiana para *Pasteurella multocida*

Os antimicrobianos de amplo espectro são frequentemente utilizados para o tratamento de infecções ocasionadas por *P. multocida* (GIORDANO et al., 2015). Em geral, as pasteurelas são sensíveis à penicilina que desde a década de 50, é utilizada como antibiótico de escolha. Contudo, como alguns isolados dessa espécie foram identificados como produtores de β -lactâmicos, para o tratamento empírico recomenda-se a combinação de β -lactâmicos associados a β -lactamase, como ampicilina e sulbactam ou amoxicilina e ácido clavulânico. Adicionalmente, outros antimicrobianos sugeridos para a terapêutica da *P. multocida* incluem cefalosporinas de segunda e terceira geração, tetraciclina, Cotrimoxazol e fluoroquinolonas (MARTIN et al., 2018).

Em gatos domésticos, com relação aos tratamentos das afecções bucais ainda existem muitas limitações, porém, na maioria das vezes, a terapêutica se baseia na administração de anti-inflamatórios e antimicrobianos. Os principais antibióticos utilizados para o tratamento de gengivite são a clindamicina, espiramicina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, metronidazol, enrofloxacina, doxiciclina e ampicilina (LYON, 2005). Deve-se ressaltar que a escolha dos antimicrobianos utilizados na maioria das vezes é feita de maneira empírica e indiscriminadamente. Pouco se conhece sobre o perfil de sensibilidade de isolados de *P. multocida* oriundas da cavidade bucal de gatos. Contudo, isolados resistentes a antimicrobianos já foram relatados (FERREIRA et al., 2015).

Em um estudo realizado com amostra de mucosa bucal de gatos domésticos, a *P. multocida* foi identificada em 10,5% das amostras. Além disso, foi avaliada a sensibilidade antimicrobiana desses isolados frente a ampicilina, ceftiofur, clotrimazol, doxiciclina, enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, florfenicol, penicilina, sulfizoxazole, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetopina. Os resultados mostraram que 12,1% das *P. multocida* apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados; a resistência mais frequente foi perante ao sulfametoxazol-trimetopina representando 75,6%, seguido pelo sulfizoxazol com 60,9% (FERREIRA et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), USP, Campus de Pirassununga (protocolo CEUA nº 1348240517). O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo de Células-tronco e Terapia Gênica/GDTI, do Departamento de Medicina Veterinária e no Laboratório de Química Biológica, do Departamento de Ciências Básicas da instituição. O delineamento experimental está representado pela figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 101 gatos domésticos, oriundos dos municípios paulistas de Pirassununga, Tambaú, São João da Boa Vista e Ribeirão Preto, localizados no Estado de São Paulo. Os animais foram selecionados de criatórios domésticos, de abrigos públicos e de

clínicas e hospitais veterinários dessas localidades supracitadas. Os critérios para inclusão dos animais na investigação foram: ausência de tratamento com antimicrobianos e sem alteração de dieta alimentar nos últimos 30 dias. Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica pelo mesmo veterinário. Durante a avaliação clínica e colheita de material, foi preenchida uma ficha cadastral do animal, na qual contém todos os dados do mesmo, como raça, idade, sexo, origem, hígidez, entre outros.

4.2. AMOSTRAS

A coleta das amostras bucais foi realizada em duplicata por meio de suabe estéril, que foi friccionado levemente nas gengivas, bochechas e dentes dos animais por cerca de 10-15 segundos. O suabe foi acondicionado em tubo estéril contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) e em caixa de isopor contendo gelo reciclável até a chegada ao laboratório. Todas as amostras foram mantidas a temperatura de 4° a 8°C até seu processamento.

4.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

As amostras bucais foram semeadas em ágar sangue de ovino 5% e ágar MacConkey e incubadas a 35° C (+/- 2° C) em aerobiose por 24 a 48 horas. Após a incubação, as placas foram inspecionadas visualmente. As colônias pequenas, acinzentadas, arredondadas ou esféricas, brilhantes, não hemolíticas e com leve odor adocicado foram submetidas à coloração de Gram, para avaliação de suas características morfo-tintoriais. Em seguida, as células bacterianas com características morfo-tintoriais do gênero *Pasteurella* foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos para confirmação do gênero e espécies: catalase, oxidase, fermentação do TSI, motilidade, indol, ornitina descarboxilase, oxidação e/ou fermentação da maltose, xilose e sacarose (DZIVA et al., 2008).

4.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Todas as amostras de *Pasteurella* obtidas na etapa supracitada foram submetidas a identificação molecular. Para tanto, o DNA bacteriano foi obtido pelo método de congelamento e aquecimento (GHOLAMIANDEKHORDI et al. 2006), com modificações. Em resumo, duas a três colônias (crescimento entre 48 a 72 horas) foram ressuspensas em 300 µL de água ultra-pura estéril. Em seguida, foram congeladas a -20°C por 10 min e aquecidas em banho-maria a 98°C por 10 min. Após aquecimento, foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e analisado por espectrofotometria ($\lambda = 260/280\text{nm}$), com a finalidade

de verificar a pureza e a concentração de DNA obtido. Posteriormente, as amostras extraídas foram estocadas a -20°C até a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Para a identificação e caracterização da *P. multocida* foram utilizados os pares oligonucleotídeos iniciadores descritos previamente por TOWNSEND et al. (1998): KMT1T7 (5' ATCCGCTATTTACCCAGTGG 3') e KMT1SP6 (5' GCTGTAAACGAACCTGCCAC 3'). A reação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 5 µL (aproximadamente 40 ng de DNA/µL) do DNA extraído dos isolados suspeitos, 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega®) e 0,5 µM de cada par de oligonucleotídeo iniciador (IDT DNA®). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 1 min a 72°C, seguidos por uma extensão final a 72°C por 5 min. Ao final da reação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5% (Sigma Aldrich®), corado em solução contendo SYBR® safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) e comparados com marcadores de DNA de 100 pb (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®).

Após essa caracterização, quatro isolados foram selecionados aleatoriamente e enviados para o sequenciamento genético com intuito de se confirmar o gênero e espécie. Para cada amostra, foi realizada a reação de PCR para *P. multocida* (oligonucleotídeos iniciadores KMT1T7 e KMT1SP6) com volume de final de 100 µL, tendo sido utilizados 10 µL de cada reação para confirmar os resultados positivos pela corrida em gel de agarose 1,5%, e os 90 µL restantes sendo purificados através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) para posterior envio para o sequenciamento molecular. As sequências obtidas foram submetidas ao BLAST para efetuar a análise por homologia com as sequências publicadas de *P. multocida*.

4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Em todos os isolados de *P. multocida* foram investigados os genes codificadores dos seguintes fatores de virulência: cápsula (*capA*, *capB*, *capD*, *capE* e *capF*), fímbrias (*ptfA*), porina (*psl*), proteínas associadas a aquisição e regulação de ferro (*exbB*, *tonB*, *tbpA* e *hgbB*), enzimas extracelulares (neuraminidase [*nanB* e *nanH*], e superóxido dismutase [*sodC* e *sodA*]), proteínas de membrana externa (*ompH* e *oma87*), toxina dermonecrótica (*toxA*) e hemaglutinina filamentosa (*pfhA*) (tabela 2). A identificação desses genes foi realizada por meio da PCR convencional de acordo com descrição prévia (DOUGHTY et al. 2000; EWERS et al. 2006; TANG et al. 2009).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para detecção dos fatores de virulência de isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos

Primers	Sequência (5' – 3')	Gene	Fragmentos (pb)	Referência
Capsula A s	TGCCAAAATCGCAGTCAG	<i>hyaD</i>	1044	Townsend <i>et al.</i> 1998
Capsula A as	TTGCCATCATTGTCAGTG	<i>htcC</i>		
Capsula B s	CATTTATCCAAGCTCCACC	<i>bcbD</i>	760	Townsend <i>et al.</i> 1998
Capsula B as	GCCCGAGAGTTTCAATCC			
Capsula D s	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	<i>dcbF</i>	657	Townsend <i>et al.</i> 1998
Capsula D as	CATCTACCCACTCAACCATATCAG			
Capsula E s	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	<i>ecbJ</i>	511	Townsend <i>et al.</i> 1998
Capsula E as	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC			
Capsula F s	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	<i>fcB</i>	851	Townsend <i>et al.</i> 1998
Capsula F as	TTCCGCCGTCAATTACTCTG			
OmpH s	CGCGTATGAAGGTTAGGT	<i>ompH</i>	438	Ewers <i>et al.</i> 2006
OmpH as	TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC			
Oma87 s	ATGAAAAAACTTTAATTGCGAGC	<i>oma87</i>	949	Ewers <i>et al.</i> 2006
Oma87 as	TGACTTGCGCAGTTGCATAAC			
Fim4 s	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	<i>ptfA</i>	432	Doughty <i>et al.</i> 2000
Fim 4 as	TCATGAATTCCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG			
NanB1 s	GTCCTATAAAGTGACGCCGA	<i>nanB</i>	584	Ewers <i>et al.</i> 2006
NanB1 as	ACAGCAAAGGAAGACTGTCC			
NanH1 s	GAATATTTGGGCGGCAACA	<i>nanH</i>	360	Ewers <i>et al.</i> 2006
NanH1 as	TTCTCGCCCTGTCATCACT			
ExbB s	GGTGGTGATATTGATGCGGC	<i>exbB</i> <i>tonB</i>	1144	Ewers <i>et al.</i> 2006
TonB as	GCATCATGCGTGCACGGTT			
SodC s	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA	<i>sodC</i>	235	Ewers <i>et al.</i> 2006
SodC as	TGGTGCGGGTGATCATCATG			
HgbB s	ACCGCGTTGGAATTATGATTG	<i>hgbB</i>	788	Ewers <i>et al.</i> 2006
HgbB as	CATTGAGTACGGCTTGACAT			
SodA s	TACCAGAATTAGGCTACGC	<i>sodA</i>	361	Ewers <i>et al.</i> 2006
SodA as	GAAACGGGTTGCTGCCGCT			
P6 s	TCTGGATCCATGAAAAAACTAACTAAAGTA	<i>psl</i>	493	Kasten <i>et al.</i> 1997
P6 as	AAGGATCCTTAGTATGTCAACACAGGACGACG			
TbPA s	TGCGACAACGAAATTTCTC	<i>tbpA</i>	728	Ewers <i>et al.</i> 2006
TbPA as	GGACAGTGCAATAAACTTGTTTACTA			
Pfha1 s	AGCTGATCAAGTGGTGAAC	<i>pfhA</i>	275	Ewers <i>et al.</i> 2006
Pfha1 as	TGGTACATTGGTGAATGCTG			
ToxA s	CTTAGATGAGCGACAAGGT	<i>toxA</i>	865	Ewers <i>et al.</i> 2006
ToxA as	GGAATGCCACACCTCTATA			

sense; as: antisense

4.6 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Todas as amostras que foram positivas para *P. multocida* foram submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos de acordo com a metodologia padrão determinada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para tanto, utilizou-se o teste de disco difusão em ágar.

As cepas de *P. multocida*, que estavam previamente armazenadas foram ressuspendidas em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) e incubadas a 37° C por 24 horas. Após este período, a concentração do inóculo foi ajustada com o meio BHI até atingir turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL). A concentração do inóculo foi confirmada por meio da leitura com espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm e densidade óptica entre 0,08 a 0,10. Após a confirmação da concentração, o inóculo foi semeado em placas com meio BHI e, após 15 minutos da semeadura, os discos de antibiograma foram distribuídos. Foram utilizados os seguintes discos (CEFAR®): amoxilina, ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, doxiciclina, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, canamicina, neomicina, norfloxacina, sulfazotrim e tetraciclina. As placas foram incubadas na estufa a 37° C por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos com auxílio de uma régua e foram interpretados conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 2 - Diâmetro dos halos de inibição dos antibióticos utilizados para o teste disco-difusão em ágar

Antibióticos	Halo de inibição (mm)		
	S ¹	I ²	R ³
Amoxilina	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Ampicilina	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Ciprofloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Cloranfenicol ^a	≥ 28	-	-
Doxiciclina ^a	≥ 23	-	-
Enrofloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Estreptomicina	≥ 15	12 - 14	≤ 11
Gentamicina	≥ 15	13 - 14	≤ 12
Canamicina	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Neomicina	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Norfloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Sulfazotrim ^a	≥ 24	-	-
Tetraciclina	≥ 19	15 - 18	≤ 14

¹: Sensível; ²: Intermediário; ³: Resistente.

^a: O diâmetro do halo para as indicações intermediária e resistente não foram definidos pelo CLSI.

Fonte: CLSI M45, 2016; FERREIRA et al 2015; MAYNOU; BACH; TERRÉ, 2017; SARANGI et al 2015.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada no software IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 25. Estatísticas descritivas foram utilizadas para determinar as frequências absolutas e relativas dos genes de virulência e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. O Teste Qui-quadrado foi adotado para determinação da significância e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

No presente estudo foram coletadas amostras bucais de 101 gatos domésticos, sem raça definida e com idade superior a um ano. Dentre esses animais, 47,5% eram machos e 45,5% eram fêmeas. Em 7% desses animais, não foram obtidas informações referentes ao sexo devido à natureza feral dos mesmos. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo diagnóstico e em 48 amostras (48/101; 47,52%) foi isolada e caracterizadas a *P. multocida*. A partir dos isolados positivos para *P. multocida*, investigou-se a presença dos fatores de virulência. A frequência dos fatores de virulência dos isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos está apresentada na tabela 3.

Tabela 3 - Frequência dos fatores de virulência dos isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos

Genes	Cepas Positivas	
	Total (n=48)	Total %
<i>hyaD - htcC</i>	48	100
<i>bcbD</i>	0	0
<i>dcbF</i>	0	0
<i>ecbJ</i>	0	0
<i>fcgD</i>	0	0
<i>ompH</i>	43	89,6
<i>oma87</i>	46	95,8
<i>ptfA</i>	11	22,9
<i>nanB</i>	43	89,6
<i>nanH</i>	40	83,3
<i>exbB/tonB</i>	39	81,3
<i>sodC</i>	5	10,4
<i>hgbB</i>	43	89,6
<i>sodA</i>	7	14,6
<i>psl</i>	4	8,3
<i>tbpA</i>	0	0
<i>pfhA</i>	0	0
<i>toxA</i>	0	0

Fonte: Própria autoria.

Sabendo que os fatores de virulência podem estar relacionados com uma maior capacidade do patógeno em causar doença, os isolados foram divididos de acordo com estado de saúde bucal dos animais amostrados, ou seja, em dois grupos: Grupo I; composto por 11 animais saudáveis, e Grupo II; com 37 gatos apresentando gengivite. Sendo assim, a frequência dos fatores de virulência também foi analisada comparando os grupos, como apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Frequência dos genes de virulência dos isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite

Genes	Sadio		Gengivite	
	Total (n=11)	Total %	Total (n=37)	Total %
<i>hyaD/htcC</i>	11	100	37	100
<i>bcbD</i>	0	0	0	0
<i>dcbF</i>	0	0	0	0
<i>ecbJ</i>	0	0	0	0
<i>fcgD</i>	0	0	0	0
<i>ompH</i>	9	81,8	34	91,9
<i>oma87</i>	10	90,9	36	97,3
<i>ptfA</i>	3	27,3	8	21,6
<i>nanB</i>	11	100	32	86,5
<i>nanH</i>	9	81,8	31	83,8
<i>exbB/tonB</i>	8	72,7	31	83,8
<i>sodC</i>	1	9,1	4	10,8
<i>hgbB</i>	11	100	32	86,5
<i>sodA</i>	1	9,1	6	16,2
<i>psl</i>	1	9,1	3	8,1
<i>tbPA</i>	0	0	0	0
<i>pfhA</i>	0	0	0	0
<i>toxA</i>	0	0	0	0

Fonte: Própria autoria.

Comparando os resultados obtidos pela análise estatística dos fatores de virulência entre ambos os grupos estudados, não foram encontradas diferenças significativas. Por outro lado, houve diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparamos o número total de animais do estudo (101) divididos entre os grupos amostrais (grupo I: 35/101; e grupo II: 66/101). Neste sentido, a *P. multocida* foi isolada mais frequentemente nas amostras oriundas de gatos domésticos com gengivite (37/66). Entretanto, entendemos que talvez este resultado seja em decorrência da desproporção amostral.

Os isolados sequenciados apresentaram 99% de homologia com cepas de *P. multocida* isoladas e identificadas em roedor (número de acesso no genBank: CP028926.1) e oriunda de ferida humana causada por mordedura de cão (NCTC11619; número de acesso no genBank: LR134514.1).

Os padrões de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *P. multocida* estão descritos na tabela 5. A gentamicina e a canamicina foram os únicos antibióticos 100% eficazes na inibição do crescimento bacteriano dos 48 isolados de *P. multocida* estudados. Os antibióticos ciprofloxacina, enrofloxacin, estreptomicina e norfloxacina apresentaram eficiência em mais de 80% dos isolados. Em contrapartida, os maiores índices de resistentes (45/48; 94%) foram observados frente a doxiciclina e tetraciclina. Ainda neste sentido, todos os isolados foram resistentes ao cloranfenicol.

Tabela 5 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos

Antibióticos	Atividade Antimicrobiana		
	Sensíveis (%)	Intermediários (%)	Resistentes (%)
Amoxicilina	36 (75%)	11 (23%)	1 (2%)
Ampicilina	36 (75%)	9 (18,75%)	3 (6,25%)
Ciprofloxacina	45 (93,75%)	3 (6,25%)	0
Cloranfenicol	0	0	48 (100%)
Doxiciclina	3 (6%)	0	45 (94%)
Enrofloxacin	47 (98%)	1 (2%)	0
Estreptomicina	44 (92%)	3 (6%)	1 (2%)
Gentamicina	48 (100%)	0	0
Canamicina	48 (100%)	0	0
Neomicina	33 (68,75%)	15 (31,25%)	0
Norfloxacin	46 (96%)	1 (2%)	1 (2%)
Sulfazotrim	35 (73%)	0	13 (27%)
Tetraciclina	3 (6%)	0	45 (94%)

Fonte: Própria autoria.

O perfil de sensibilidade a antimicrobianos também foi analisado de acordo com os grupos do estudo (tabela 6). Os isolados pertencentes ao Grupo I, gatos saudáveis, foram totalmente sensíveis aos antibióticos enrofloxacin, gentamicina e canamicina, e apresentaram alta sensibilidade a neomicina (90,9%), norfloxacin (81,8%), sulfazotrim (81,8%) e ciprofloxacina (72,8%). Cem por cento (11/11, 100%) dos isolados foram resistentes ao cloranfenicol, enquanto 90% (10/11) dos isolados apresentaram resistência a doxiciclina e tetraciclina. Em relação ao grupo II, os isolados apresentaram-se 100% resistentes ao cloranfenicol e 94% foram resistentes a doxiciclina e tetraciclina. Em contrapartida, foram totalmente sensíveis a ciprofloxacina, gentamicina, canamicina e norfloxacin. Também apresentaram alta sensibilidade aos antibióticos enrofloxacin (97,3%) e estreptomicina (97,3%).

Tabela 6 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite

Antimicrobianos	Atividade Antimicrobiana					
	Sadios (n=11)			Gengivite (n=37)		
	Sensíveis (%)	Intermediários (%)	Resistentes (%)	Sensíveis (%)	Intermediários (%)	Resistentes (%)
Amoxicilina	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0	29 (78,4%)	7 (18,9%)	1 (2,7%)
Ampicilina	7 (63,6%)	2 (18,2%)	2 (18,2%)	29 (78,4%)	7 (18,9%)	1 (2,7%)
Ciprofloxacina	8 (72,8%)	3 (27,2%)	0	37 (100%)	0	0
Cloranfenicol	0	0	11 (100%)	0	0	37 (100%)
Doxiciclina	1 (9,1%)	0	10 (90,9%)	2 (5,4%)	0	35 (94,6%)
Enrofloxacina	11 (100%)	0	0	36 (97,3%)	1 (2,7%)	0
Estreptomicina	8 (72,8%)	3 (27,2%)	0	36 (97,3%)	0	1 (2,7%)
Gentamicina	11 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0
Canamicina	11 (100%)	0	0	37 (100%)	0	0
Neomicina	10 (90,9%)	1 (9,1%)	0	23 (62,2%)	14 (37,8%)	0
Norfloxacina	9 (81,8%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	37 (100%)	0	0
Sulfazotrim	9 (81,8%)	0	2 (18,2%)	26 (70,3%)	0	11 (29,7%)
Tetraciclina	1 (9,1%)	0	10 (90,9%)	2 (5,4%)	0	35 (94,6%)

Fonte: Própria autoria.

6. DISCUSSÃO

P. multocida é considerada um patógeno oportunista do trato respiratório superior de várias espécies de animais domésticos, inclusive é frequentemente isolada e identificada na cavidade bucal de gatos saudáveis (ELLIOTT et al., 2005; HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; FRESHWATER, 2008; LAM; PAGE, 2015; RAJKHOWA, 2015). Atualmente, tem sido considerada um patógeno emergente e de grande importância para a medicina humana, pois frequentemente é isolada de feridas provocadas por mordeduras e arranhaduras de gatos (MARTIN et al., 2018); contudo, há relatos de infecção em humanos transmitida apenas pelo contato direto entre os tutores e seus gatos de estimação (FERREIRA; TREGER; BUSEY, 2015; ZARLASHT; KHAN, 2018).

Em adição, *P. multocida* tem sido identificada em amostras obtidas da cavidade bucal de gatos com gengivite e alguns estudos apontam para uma possível associação entre esta espécie bacteriana e a etiopatogenia da gengivite felina (DOLIESLAGER et al., 2011). Nesse contexto, o nosso objetivo foi isolar e caracterizar isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com gengivite, buscando compreender sua participação na etiopatogenia mais a ocorrência em quadros de gengivite felina. Além disso, realizou-se um estudo do perfil de sensibilidade a antimicrobianos comumente utilizados na clínica médica veterinária e humana.

No presente estudo, foram coletados 101 suabes da cavidade bucal de gatos domésticos e em 48 (48/101; 47,5%) foram isoladas e caracterizada amostras de *P. multocida*. A frequência de ocorrência observada neste estudo encontra-se acima da relatada anteriormente por Ferreira et al. (2015) de 10,5% (20/191) e abaixo da relatada por Freshwater (2008) de 89,97% (368/409). Os diferentes meios de cultura utilizados para o isolamento, meio de transporte de amostras e os testes bioquímicos são as possíveis explicações para essas diferenças de frequência. Por exemplo, Freshwater (2008) utilizou ágar sangue de ovino suplementado com clindamicina (5 mg). Num experimento piloto realizado pelo grupo de estudo em questão, foi evidenciado que a suplementação dos meios de cultura com antibiótico para amostras bucais realmente facilita o isolamento e identificação bacteriana, uma vez que inibe uma boa parte da microbiota. Entretanto, para a escolha do antibiótico se faz necessário o conhecimento do perfil de sensibilidade de isolados de *P. multocida*.

O estudo genético relacionado aos fatores de virulência é de grande importância para a epidemiologia, a imunologia, a patogenia e a prevenção de enfermidades infecciosas. Ademais, a identificação dos fatores de virulência de isolados de *P. multocida* oriundos de gatos saudáveis e

com gengivite pode nos sugerir quais fatores podem estar ou não associados a patogenicidade. Desta maneira, os 48 isolados de *P. multocida* foram submetidos a PCR para identificar os genes relacionados a fatores de virulência.

A cápsula é considerada um dos principais fatores de virulência da *P. multocida* e foi identificada em 100% dos isolados estudados sendo identificada predominantemente como do tipo A. Vários estudos têm mostrado que esse tipo capsular é o mais frequente em isolados de *P. multocida* oriundos de diferentes espécies animais (ARUMUGAM et al., 2011; DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; EWERS et al., 2006; GARCIA et al., 2011; FURIAN et al., 2013), inclusive em gatos domésticos e em humanos (FERREIRA et al., 2015; UJVÁRI et al., 2019; UJVÁRI; MAKRAI; MAGYAR, 2019). Ademais, o tipo capsular A tem sido associado à colonização das mucosas do trato respiratório de várias espécies animais e a quadros clínicos de enfermidade respiratória mediante a forte ligação com receptores encontrados em macrófagos alveolares (BOYCE; CHUNG; ADLER, 2000). Por fim, nossos achados reforçam que o tipo capsular A provavelmente não apresenta especificidade em relação a espécie animal (EWERS et al., 2006).

Os genes relacionados a aquisição e regulação de ferro desempenham um papel fundamental na sobrevivência do patógeno no hospedeiro (EWERS et al., 2006; HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; KHAMESIPOUR; MOMTAZ; MAMOREH, 2014; TOWNSEND et al., 2000). A prevalência desses genes foi de 81,3% para *exbB/tonB* e 89,6% para *hgbB*. Esses resultados foram semelhantes aos observados em estudos realizados anteriormente (BETHE et al., 2009; EWERS et al., 2006). A proteína codificada pelo gene *hgbB* auxilia a *P. multocida* a obter ferro através da hemina (VERMA et al., 2013), enquanto o complexo *exbB - tonB* é responsável pela força motriz do próton para internalização do ferro no espaço periplasmático (EWERS et al., 2006). Com isso, a frequência normalmente esperada para os genes que codificam as proteínas de aquisição e regulação de ferro é alta (BETHE et al., 2009; EWERS et al., 2006; KREWULAK; VOGEL, 2008; TANG et al., 2009).

A frequência de identificação dos genes *ompH* e *oma87* foi de 89,6% e 95,8%, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados em isolados de *P. multocida* oriundos de suínos (TANG et al., 2009), de bovinos (KHAMESIPOUR; MOMTAZ; MAMOREH, 2014) e de gatos (FERREIRA et al., 2015). A importância das proteínas codificadas pelos genes supracitados é confirmada pela alta frequência que os mesmos são identificados em isolados de *P. multocida* (BETHE et al., 2009; DAVIES; MACCORQUODALE; REILLY, 2004; EWERS et al., 2006). Essas proteínas atuam como

barreiras impedindo que moléculas tóxicas entrem nas células, auxiliando a sobrevivência bacteriana no hospedeiro. Além disso, auxiliam na absorção de nutrientes e na troca de moléculas por meio de uma interação próxima ao hospedeiro (HATFALUDI et al., 2010).

Em relação aos genes codificadores das sialidases, *nanB* e *nanH*, nossos resultados foram os esperados e semelhantes aos estudos prévios (BETHE et al., 2009; EWERS et al., 2006; FERREIRA et al., 2015; FURIAN, et al., 2013; MIZAN et al., 2000). As sialidases são enzimas que removem o ácido siálico conjugado a glicoproteínas e glicolípídeos, que é utilizado como fonte de carbono para o metabolismo bacteriano (HATFALUDI et al., 2010). Ainda neste sentido, o ácido siálico também é incorporado na membrana externa do patógeno, auxiliando na inibição da resposta imune do hospedeiro (VIMR; LITCHTENSTEIGER, 2002). Isso sugere que essas enzimas aumentam a virulência da bactéria desempenhando um papel na colonização no hospedeiro (SARANGI et al., 2015; TATUM; YERSIN; BRIGGS, 2005).

A toxina produzida pela *P. multocida*, *toxA*, não foi identificada em nenhum dos 48 isolados estudados. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos previamente (FERREIRA et al., 2015; UJVÁRI; MAKRAI; MAGYAR, 2019), os quais observaram que o gene *toxA* estava ausente em isolados de *P. multocida* oriundos de gatos. Alguns estudos sugerem que este gene esteja mais relacionado às cepas do tipo capsular D e responsável pelos sinais clínicos associados à rinite atrófica em suínos (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; FERREIRA et al., 2015) e pneumonia em pequenos ruminantes (EWERS et al. 2006; SHAYEGH; ATASHPAZ; HEJAZI, 2008)

No presente estudo, a frequência do gene *ptfA*, relacionado à codificação da fimbria do tipo IV e consequentemente à adesão bacteriana (HATFALUDI et al., 2010), foi de 22,9%, diferindo de outros estudos, que observaram alta ocorrência deste gene em isolados de *P. multocida* oriundos de gatos domésticos e de outras espécies animais (BETHE et al., 2009; EWERS et al., 2006; FERREIRA et al., 2016; FURIAN et al., 2013; TANG et al., 2009). Os genes superóxido dismutase, *sodA* (14,5%) e *sodC* (10,4%), foram identificados em poucos isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos, diferindo de outros estudos prévios que detectaram esses genes em 100 % das cepas estudadas (EWERS et al., 2006; FURIAN et al., 2013). Adicionalmente, em nenhum dos 48 isolados estudados foram identificados os genes *pfhA* e *tbpA*. Segundo Ewers et al. (2006), a frequência de ocorrência desses genes pode variar amplamente entre os isolados de *P. multocida*, devido às origens animal e geográfica. Além disso, é possível que alguns genes relacionados aos fatores de virulência estejam relacionados a presença da cápsula e seu tipo capsular (ASKI;

TABATABAEI, 2016). Por exemplo, foi sugerido que o tipo capsular A está frequentemente associado ao gene *pfhA*. Entretanto, nossos resultados não conseguiram constatar tal evidência.

Alguns trabalhos já publicados objetivaram identificar e caracterizar os fatores de virulência em isolados de *P. multocida* oriundos de gatos domésticos, principalmente de amostras da nasofaringe (ASKI; TABATABAEI, 2016; EWERS et al., 2006; FERREIRA et al., 2015; FERREIRA et al., 2016). Entretanto, até o presente momento, esse é o primeiro estudo que caracterizou os fatores de virulência em isolados de *P. multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite. A análise estatística dos resultados mostrou não haver diferença entre os dois grupos amostrais; contudo, acredita-se que a discrepância entre o número de isolados de ambos os grupos possa ser uma explicação para falta de diferença entre os isolados bacterianos, sendo considerada uma das principais limitações do presente estudo.

O perfil de sensibilidade antimicrobiana mostrou que os isolados apresentaram resultados similares para resistência bacteriana, tanto como para a sensibilidade, independentemente do grupo experimental investigado. A maioria dos nossos isolados de *P. multocida* foram resistentes ao cloranfenicol, doxiciclina e tetraciclina. Esses achados foram contraditórios ao perfil de sensibilidade obtidos de *P. multocida* oriundas de ruminantes, em que os isolados apresentaram alta porcentagem de sensibilidade frente ao cloranfenicol e a tetraciclina (KUMAR et al., 2009; MARRU; ANIJAJO; HASSEN, 2013). Em adição, esses achados são preocupantes do ponto de saúde pública, uma vez que as tetraciclinas podem ser utilizadas como tratamento alternativo para infecções ocasionadas pela *P. multocida* em humanos (FERREIRA; TREGER; BUSEY, 2015; FRESHWATER, 2008).

Por outro lado, altas taxas de sensibilidade foram observadas frente as quinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina e norfloxacina). Esses resultados mostram-se relevantes, pois esta classe de antibiótico é também utilizada como terapêutica alternativa para a infecção pela *P. multocida* em pacientes humanos, que apresentam alergia a penicilinas ou não responderam ao tratamento com este antibiótico (FRESHWATER, 2008; MARTIN et al., 2018). Contudo, no experimento desenvolvido pelo grupo de Ferreira e colaboradores (2015), foi observada a ocorrência de resistência bacteriana de *P. multocida*, a partir de amostras bucais de gatos, frente a classe de quinolonas. Porém, os próprios pesquisadores consideraram que este acontecimento possa ser um fato isolado e raro (FERREIRA et al., 2015). Embora, alguns estudos de sensibilidade realizados em outros países e com amostras de *P. multocida* isoladas de diferentes espécies mostraram a ocorrência de resistência frente às quinolonas (HENDRIKSEN et al.,

2008; PORTIS et al., 2012). Nós acreditamos que talvez as amostras *P. multocida* isoladas de gatos domésticos não tenham ainda sofrido pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência bacteriana frente as quinolonas, pois esta classe de antibiótico não tem sido utilizada com frequência na rotina da clínica veterinária de felinos, uma vez que os efeitos adversos podem ser severos para esta espécie animal, diferentemente do que se observa em cães domésticos (GELATT et al., 2001; WIEBE; HAMILTON, 2002).

Para a rotina clínica veterinária, os nossos achados são interessantes e profícuos já que os antibióticos utilizados com frequência para o tratamento de infecções do trato respiratório superior e para a gengivite felina apresentaram moderadas a elevadas taxas de sensibilidade, como ampicilina, amoxicilina e sulfazotrim. Esses resultados também foram similares aos observados previamente em amostras de *P. multocida* isoladas da cavidade bucal de gatos (FERREIRA et al., 2015; FRESHWATER, 2008). Pelos resultados obtidos as classes de beta-lactâmicos podem e devem ser consideradas para os tratamentos empíricos.

Por fim, nós sabemos que o presente trabalho é uma importante contribuição a respeito da associação da *P. multocida* em infecções orais em gatos domésticos e também devido a sua importância em saúde pública. Entretanto, sabemos que há limitações, tais como diferenças numéricas entre os isolados bacterianos dos grupos experimentais e a ausência de teste de sensibilidade frente a penicilina G e a espiramicina. A penicilina G é o antibiótico de escolha para o tratamento de infecções pela *P. multocida* em humanos e animais domésticos, enquanto que a espiramicina é usada frequentemente para o tratamento de afecções bucais em pequenos animais. Porém, nós consideramos que os nossos achados foram relevantes e nos permitirão formular novas hipóteses experimentais. Ademais, a obtenção de um banco de isolados de *P. multocida* nos permitirão estudos direcionados à imunologia e aos aspectos de patogenicidade na interação entre *P. multocida* e felinos domésticos.

7. CONCLUSÃO

- *Pasteurella multocida* foi encontrada frequentemente em amostras bucais oriundas da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite dentro do delineamento proposto.
- O tipo capsular A foi o mais frequente entre isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite dentro do número amostral relatado.
- Os principais genes relacionados aos fatores de virulência de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite foram *ompH*, *oma87*, *nanB*, *nanH*, *exxB/tonB* e *hgbB*.
- A maioria dos isolados de *P. multocida* foi sensível a enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, neomicina e canamicina.
- A maioria dos isolados de *P. multocida* foi resistente ao cloranfenicol, doxiciclina e a tetraciclina.
- O banco de *Pasteurella multocida* possui 48 isolados devidamente caracterizados e que nos permitirão novos experimentos.

8. REFERÊNCIAS

ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em: <www.abinpet.org.br>. Acesso em: 22 jul. 2019.

ABRAHAMIAN, F. M.; GOLDSTEIN, E. J. C. Microbiology of animal bite wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 231–246, 2011.

ARUMUGAM, N. D. et al. Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts - a comparison of phenotypic and genotypic methods. **Tropical biomedicine**, v. 28, n. 1, p. 55–63, abr. 2011.

ASKI, H. S.; TABATABAEI, M. Occurrence of virulence-associated genes in *Pasteurella multocida* isolates obtained from different hosts. **Microbial Pathogenesis**, v. 96, p. 52–57, 1 jul. 2016.

BAGLEY, K. C. et al. *Pasteurella multocida* Toxin Activates Human Monocyte-Derived and Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells In Vitro but Suppresses Antibody Production In Vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 413–421, 1 jan. 2005.

BETHE, A. et al. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 97–105, 20 out. 2009.

BLÖCKER, D. et al. *Pasteurella multocida* toxin (PMT) activates RhoGTPases, induces actin polymerization and inhibits migration of human dendritic cells, but does not influence macropinocytosis. **International Immunology**, v. 18, n. 3, p. 459–464, 1 mar. 2006.

BORRATHYBAY, E. et al. Capsule thickness and amounts of a 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 3–4, p. 215–227, 30 dez. 2003.

BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition,

function and genetics. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n. 1–2, p. 153–160, 29 set. 2000.

BOYCE, J. D., et al., 2010. *Pasteurella*, p.325-340. In: Prescott J.F. (Ed.), **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4th ed. Blackwell Publishing, Ames

CARTER, G. R.; DE ALWIS, M. C. L. 1989 Haemorrhagic Septicaemia. In: *Pasteurella* and Pasteurellosis (AdlamC & RutterJM, eds), pp. 131–160. **Academic Press Limited, London**.

CHANTER, N.; GOODWIN, R. F.; RUTTER, J. M. Comparison of methods for the sampling and isolation of toxigenic *Pasteurella multocida* from the nasal cavity of pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 47, n. 3, p. 355–358, nov. 1989.

CHRISTENSEN, H. et al. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 57, n. 1, p. 166–178, 1 jan. 2007.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. **Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift**, v. 123, n. 1–2, p. 20–30, 2010.

CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Avian pasteurellosis: Taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis. **Avian Pathology**, v. 26, n. 3, p. 461–483, 12 set. 1997.

CHUNG, J. Y. et al. Role of Capsule in the Pathogenesis of Fowl Cholera Caused by *Pasteurella multocida* Serogroup A Role of Capsule in the Pathog. v. 69, n. 4, p. 2487–2492, 2001.

CHUNG, J. Y.; ZHANG, Y.; ADLER, B. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. **FEMS microbiology letters**, v. 166, n. 2, p. 289–96, 15 set. 1998.

DA SILVA CORREIA, J. et al. Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 24,

p. 21129–21135, 15 jun. 2001.

DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. **Veterinary Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 145–158, 5 abr. 2004.

DEANGELIS, P. L. et al. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. **Carbohydrate research**, v. 337, n. 17, p. 1547–52, 27 set. 2002.

DEANGELIS, P. L.; WHITE, C. L. Identification and Molecular Cloning of a Heparosan Synthase from *Pasteurella multocida* Type D. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7209–7213, 1 mar. 2002.

DIEHL, K.; ROSYCHUK, R. A. W. **Feline gingivitis - Stomatitis-pharyngitis** **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**. Elsevier, , 1 jan. 1993.

DOLIESLAGER, S. M. J. et al. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 93–98, fev. 2011.

DOLIESLAGER, S. M. J. et al. Novel bacterial phylotypes associated with the healthy feline oral cavity and feline chronic gingivostomatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 428–432, 1 jun. 2013.

DOUGHTY, S. W.; RUFFOLO, C. G.; ADLER, B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 1–2, p. 79–90, 1 mar. 2000.

DZIVA, F., et al. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 1–22, 2008.

ELLIOTT, D. R. et al. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470–5476, 2005.

EWERS, C. et al. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3–4, p. 304–317, 31 maio 2006.

FERREIRA, J.; TREGER, K.; BUSEY, K. Pneumonia and disseminated bacteremia with *Pasteurella multocida* in the immune competent host: A case report and a review of the literature. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 15, p. 54–56, 2015.

FERREIRA, T. S. P. et al. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in *P. multocida* strains isolated from cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 271–277, maio 2015.

FERREIRA, T. S. P. et al. Pheno- and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cats, dogs and rabbits from Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 48–52, 1 abr. 2016.

FRANK, G. H. 1989. Pasteurellosis of cattle. In *Pasterella* and Pasteurellosis, pp. 197-222. Edited by C. Adlam & J. M. Rutter. **London : Academic Press**.

FRESHWATER, A. Why Your Housecat's Trite Little Bite Could Cause You Quite a Fright: A Study of Domestic Felines on the Occurrence and Antibiotic Susceptibility of *Pasteurella multocida*. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 8–10, p. 507–513, 3 set. 2008.

FURIAN, T. Q. et al. Detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cases of fowl cholera by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 177–182, fev. 2013.

GARCÍA-ALVAREZ, A. et al. Characterization of *Pasteurella multocida* associated with ovine pneumonia using multi-locus sequence typing (MLST) and virulence-associated gene profile analysis and comparison with porcine isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 204, p. 180–187, 1 maio 2017.

GARCIA, N. et al. Associations between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella*

multocida isolates from pigs in Spain. **Veterinary Record**, v. 169, n. 14, p. 362–362, 1 out. 2011.

GAUTIER, A.-L. et al. Rapid and Accurate Identification of Human Isolates of *Pasteurella* and Related Species by Sequencing the *sodA* Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2307–2314, 1 maio 2005.

GELATT, K. N. et al. Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 2, p. 99–106, 1 jun. 2001.

GHOLAMIANDEKHORDI, A. R. et al. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1–2, p. 143–152, 10 mar. 2006.

GIORDANO, A. et al. Clinical Features and Outcomes of *Pasteurella multocida* Infection. **Medicine**, v. 94, n. 36, p. e1285, set. 2015.

GIRARD, N. et al. Periodontal health status in a colony of 109 cats. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 26, n. 3, p. 147–155, 2009.

GLISSON J.R., et al., 2008. Pasteurellosis, avibacteriosis, gallibacteriosis, rimerellosis and pseudotuberculosis, p.12-18. In: Dufour-Zavala L. (Ed.), **A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens**. 5th ed. American Association of Avian Pathologists, Georgia.

GOLDSTEIN, E. J. Management of human and animal bite wounds. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 21, p. 1275–1279, 1989.

GUSTAVSSON, O. et al. A wide spectrum of fastidious and ampicillin-susceptible bacteria dominate in animal-caused wounds. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 1315–1321, 19 ago. 2016.

HARIHARAN, H. et al. Aerobic bacteria from mucous membranes, ear canals, and skin

wounds of feral cats in Grenada, and the antimicrobial drug susceptibility of major isolates. **“Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases”**, v. 34, n. 34, p. 129–134, 2010.

HARPER, M. et al. *Pasteurella multocida* Expresses Two Lipopolysaccharide Glycoforms Simultaneously, but Only a Single Form Is Required for Virulence: Identification of Two Acceptor-Specific Heptosyl I Transferases. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 75, n. 8, p. 3885–3893, 2007.

HARPER, M. et al. ***Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: The long and the short of it** **Veterinary Microbiology** Elsevier, , 21 nov. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511003002>>. Acesso em: 11 fev. 2019

HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. The Key Surface Components of *Pasteurella multocida*: Capsule and Lipopolysaccharide. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 39–51.

HARPER, M. et al. Development of a Rapid Multiplex PCR Assay To Genotype *Pasteurella multocida* Strains by Use of the Lipopolysaccharide Outer Core Biosynthesis Locus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 477–485, fev. 2015.

HARPER, M.; BOYCE, J. D. The Myriad Properties of *Pasteurella multocida* Lipopolysaccharide. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 254, 21 ago. 2017.

HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. ***Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 Years after Pasteur** **FEMS Microbiology Letters** Blackwell Publishing Ltd, , 1 dez. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00442.x>>. Acesso em: 22 jan. 2019

HATFALUDI, T. et al. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1–2, p. 1–17, 29 jul. 2010.

HEDDLESTON, K. L.; GALLAGHER, J. E.; REBERS, P. A. Fowl Cholera: Gel Diffusion

Precipitin Test for Serotyping *Pasteurella multocida* from Avian Species. **Avian Diseases**, v. 16, n. 4, p. 925, jul. 1972.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 28, 8 dez. 2008.

HEY, P. et al. Cirrhosis, cellulitis and cats: a “purrfect” combination for life-threatening spontaneous bacterial peritonitis from *Pasteurella multocida*. **Case Reports**, v. 2012, n. nov09 1, p. bcr2012007397–bcr2012007397, 11 nov. 2012.

HOLST, E. et al. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 2984–2987, 1992.

ICSP - International Committee on Systematics of Prokaryotes. **Names of taxa covered by the ICSP Subcommittee on the Taxonomy of Pasteurellaceae. In:** <http://www.the-icsp.org/taxa-covered-family-pasteurellaceae>. **Capturado dia 09 de janeiro de 2019.**

KHAMESIPOUR, F.; MOMTAZ, H.; MAMOREH, M. A. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 536, 2014.

KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1781–1804, 1 set. 2008.

KUMAR, P. et al. Identification of *Pasteurella multocida* isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 573–578, abr. 2009.

KWO, S.; AGARWAL, J. P.; MELETIOU, S. Current treatment of cat bites to the hand and wrist. **Journal of Hand Surgery**, v. 36, n. 1, p. 152–153, 2011.

LAINSON, F. A. et al. Occurrence of [copper, zinc]-cofactored Superoxide dismutase in

Pasteurella haemolytica and its serotype distribution. **FEMS Microbiology Letters**, v. 142, n. 1, p. 11–17, 1 ago. 1996.

LAM, P. W.; PAGE, A. V. *Pasteurella multocida* non-native joint infection after a dog lick: A case report describing a complicated two-stage revision and a comprehensive review of the literature. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale**, v. 26, n. 4, p. 212–7, 2015.

LAX, A. J.; CHANTER, N. Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 81–87, 1990.

LEE, M. D. et al. A survey of potential virulence markers from avian strains of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 213–225, 1 fev. 1991.

LUGTENBERG, B. et al. Biochemical and immunological characterization of cell surface proteins of *Pasteurella multocida* strains causing atrophic rhinitis in swine. **Infection and immunity**, v. 52, n. 1, p. 175–82, abr. 1986.

LYON, K. F. Gingivostomatitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 4, p. 891–911, jul. 2005.

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., Dunlap P.L. & Clark D.P. 2010. Princípios de genética bacteriana. **Microbiologia de Brock** 12:278-309.

MARRU, H. D.; ANIJAJO, T. T.; HASSEN, A. A. A study on Ovine pneumonic pasteurellosis: Isolation and Identification of *Pasteurellae* and their antibiogram susceptibility pattern in Haramaya District, Eastern Hararghe, Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 239, 1 dez. 2013.

MARTIN, T. C. S. et al. *Pasteurella multocida* line infection: a case report and review of literature. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 420, 23 dez. 2018.

MAYNOU, G.; BACH, A.; TERRÉ, M. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2682–2694, 1 abr. 2017.

McCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, jun. 2000.

MIZAN, S. et al. Cloning and Characterization of Sialidases with 2-6' and 2-3' Sialyl Lactose Specificity from *Pasteurella multocida*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, p. 6874–6883, 15 dez. 2000.

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

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 67, n. 4, p. 593–656, dez. 2003.

O'NEILL, D. G. et al. Prevalence of disorders recorded in cats attending primary-care veterinary practices in England. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 2, p. 286–291, 2014.

OEHLER, R. L. et al. Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 439–447, 2009.

PETTIT, R. K.; ACKERMANN, M. R.; RIMLER, R. B. Receptor-mediated binding of *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 69, n. 1, p. 94–100, jul. 1993.

PORTIS, E. et al. A ten-year (2000–2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex— *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* —in the United States and Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 5, p. 932–944, 22 set. 2012.

QUINN et al. 2005. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 512p

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, jun. 2002.

RAJKHOWA, S. Development of a novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* from pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 293–298, set. 2015.

RHOADES, K. R.; RIMLER, R. B. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. **Avian diseases**, v. 31, n. 4, p. 895–8, 1987.

RIMLER, R. B.; RHOADES, K. R. Solubilization of Membrane-Associated Cross-Protection Factor(s) of *Pasteurella multocida*. **Avian Diseases**, v. 33, n. 2, p. 258, abr. 1989.

ROSNER, H. et al. Hyaluronic acid and a (1----4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. **Carbohydrate research**, v. 223, p. 329–33, jan. 1992.

SARANGI, L. N. et al. Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, p. 33–39, 1 fev. 2015.

SELLYEI, B.; BÁNYAI, K.; MAGYAR, T. Characterization of the ptf A Gene of Avian *Pasteurella Multocida* Strains by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 607–610, jul. 2010.

SHAYEGH, J.; ATASHPAZ, S.; HEJAZI, M. S. Virulence Genes Profile and Typing of Ovine *Pasteurella multocida*. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 3, n. 4, p. 206–213, 1 abr. 2008.

SIJU, J. et al. Cloning and Characterization of Type 4 Fimbrial Gene (ptfA) of *Pasteurella*

multocida Serogroup B:2 (Strain P52). **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 4, p. 397–404, 23 maio 2007.

SMITH, S. G. J. et al. A molecular Swiss army knife: *ompA* structure, function and expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 273, n. 1, p. 1–11, 1 ago. 2007.

SOL, P. M.; VAN DE KAR, N. C. A. J.; SCHREUDER, M. F. Cat induced *Pasteurella multocida* peritonitis in peritoneal dialysis: A case report and review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 2, p. 211–213, 1 mar. 2013.

STURGEON, A. et al. Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 2, p. 223–229, 2014.

SWORDS, W. E. et al. Sialylation of Lipooligosaccharides Promotes Biofilm Formation by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 106–113, 1 jan. 2004.

TALAN, D. A. et al. Bacteriologic Analysis of Infected Dog and Cat Bites. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 85–92, 14 jan. 1999.

TANG, X. et al. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 951–958, 1 abr. 2009.

TATUM, F. M.; YERSIN, A. G.; BRIGGS, R. E. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* fhaB2 mutant in turkeys. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 1–2, p. 9–17, jul. 2005.

TOWNSEND, K. M. et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 924–929, 2001.

UJVÁRI, B. et al. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from human

infections. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, p. 37–43, 1 abr. 2019.

UJVÁRI, B.; MAKRAI, L.; MAGYAR, T. Virulence gene profiling and *ompA* sequence analysis of *Pasteurella multocida* and their correlation with host species. **Veterinary Microbiology**, v. 233, p. 190–195, jun. 2019.

VALENTINE, J. S. et al. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 563–593, 13 jun. 2005.

VAPALAHTI, K. et al. Health and Behavioral Survey of over 8000 Finnish Cats. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 70, 29 ago. 2016.

VERMA, S. et al. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 37, n. 1, p. 83–89, 25 mar. 2013.

VIMR, E.; LICHTENSTEIGER, C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 254–257, 1 jun. 2002.

VIMR, E. R. et al. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 1, p. 132–153, 1 mar. 2004.

WEESE, S. J. et al. The oral and conjunctival microbiotas in cats with and without feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 1–11, 2015.

WHYTE, A. et al. Oral Disease and Microbiota in Free-Roaming Cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 32, n. 3, p. 91–95, 1 set. 2017.

WIEBE, V.; HAMILTON, P. Fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 11, p. 1568–71, 1 dez. 2002.

WILSON, B. A.; HO, M. *Pasteurella multocida*: From Zoonosis to cellular microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 631–655, 1 jul. 2013.

ZARLASHT, F.; KHAN, M. A Case of Recurrent *Pasteurella* Bacteremia in an Immunocompetent Patient with No Animal Bite. **American Journal of Case Reports**, v. 19, p. 95–98, 25 jan.