

## Ocorrência de genes *tad* associados à formação de biofilme em isolados de *Pasteurella multocida* de pulmões de suínos com pneumonia<sup>1</sup>

Danny Franciele da S.D. Moraes<sup>2</sup>, Laila Natasha S. Brandão<sup>2</sup>, Leticia C. Pitchenin<sup>2</sup>, João Xavier O. Filho<sup>3</sup>, Nelson Morés<sup>3</sup>, Luciano Nakazato<sup>2</sup> e Valéria Dutra<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT-** Moraes D.F.S.D., Brandão L.N.S., Pitchenin L.C., Filho J.X.O., Morés N., Nakazato L. & Dutra V. 2014. [Occurrence of *tad* genes associated with biofilm formation in isolates of *Pasteurella multocida* from lungs of pigs with pneumonia.] Ocorrência de genes *tad* associados à formação de biofilme em isolados de *Pasteurella multocida* de pulmões de suínos com pneumonia. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(12):1147-1152. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brazil. E-mail: [valdutra@ufmt.br](mailto:valdutra@ufmt.br)

Nowadays pig intensive production systems increase microbial selection pressure favoring spread of respiratory diseases. The bacteria *Pasteurella multocida* is associated with various respiratory diseases in pigs under farming conditions causing high economic losses. In vitro biofilm formation has been described in *P. multocida* which role is described in tissue colonization, enhancing resistance to host defenses and antibiotics. The aims of this study were to analyze the occurrence of *P. multocida* in pig pneumonia and health lung microbiota, and occurrence of *tad* locus genes in these isolates. Seventy isolates of *P. multocida* were analyzed which sixty seven were from lungs with lesion and three from healthy lungs. Serotype A occurred mainly in lung lesion (85.71%), in healthy lung, instead, only serotype D was observed. Genes *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* and *tadG* were present in 89.55% isolates from lesion lung. Genes *tadA*, *tadB* and *tadC* were present in all isolates from healthy lungs but, *tadD*, *tadE*, *tadF* and *tadG* were present in 0%, 33.3%, 33.3% and 66.6%, respectively. This work associated *tadD*, *tadE* and *tadF* gene positive isolates of *P. multocida* to lung pneumonic lesions.

INDEX TERMS: Swine, *Pasteurella multocida*, gene *tad*, pneumonia.

**RESUMO.-** Os atuais sistemas de criação intensiva de suínos aumentam a pressão de seleção microbiana propiciando a disseminação de doenças respiratórias. A bactéria *Pasteurella multocida* é associada a diversas patologias respiratórias em animais submetidos a esse tipo de criação, causando grandes perdas econômicas. A formação de biofilme foi descrita *in vitro* em *P. multocida* e fatores analisados indicaram a facilitação na colonização dos tecidos,

aumentando a resistência às defesas do hospedeiro e aos antibióticos. Os objetivos deste trabalho foram analisar a ocorrência de *P. multocida* em pneumonias de suínos e na microbiota de pulmões sem lesão e a ocorrência dos genes do locus *tad* nestes isolados. Foram analisados 70 isolados de *P. multocida* de pulmões, sendo sessenta e sete com lesão e três sem lesão. Isolados do sorotipo A ocorreram principalmente em pulmões com lesões (85,71%), enquanto em pulmões sem lesão observou-se somente o sorotipo D. Os genes *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG* estavam presentes em 89,55% dos isolados de pulmões com lesões. Os genes *tadA*, *tadB* e *tadC* estavam presentes em todos os isolados de pulmões sem lesão, porém os genes *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG* estavam presentes em 0%, 33,3%, 33,3% e 66,6%, dos isolados sem lesão, respectivamente. Neste trabalho observou-se a associação da ocorrência dos

<sup>1</sup> Recebido em 28 de fevereiro de 2014.

Aceito para publicação em 7 de julho de 2014.

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária, Departamento de Clínica Médica Veterinária do Hospital Veterinário, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [valdutra@ufmt.br](mailto:valdutra@ufmt.br)

<sup>3</sup> Embrapa Suínos e Aves, Cx. Postal 21, Concordia, SC 89700-000, Brasil.

genes *tadD*, *tadE* e *tadF* em isolados de *P. multocida* e a presença de lesões em pulmões.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Suínos, *Pasteurella multocida*, genes *tad*, pneumonia.

## INTRODUÇÃO

*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) é um bacilo Gram-negativo capaz de causar doenças em várias espécies, levando a perdas econômicas, especialmente associadas às indústrias de processamento de produtos de origem animal, no mundo todo (Borowski 2001, Ribeiro et al. 2012). Esta bactéria é transmitida por pequenas quantidades de partículas suspensas no ar e pelo contato direto com animais doentes, sendo capaz de causar patologias como a cólera aviária, septicemia e pneumonia em bovinos, rinite atrófica progressiva, pleurisia e pneumonia em suínos (Boyce et al. 2010). Uma vez que faz parte da microbiota da mucosa oral de cães e gatos, casos de pasteurelose em humanos são geralmente associadas ao contato com esses animais, através de mordeduras e/ou arranhaduras (Collins et al. 2012, Nagata et al. 2013, Nguefack et al. 2014).

São descritos cinco sorotipos: *A*, *B*, *D*, *E* e *F* de acordo com os antígenos capsulares (Townsend et al. 2001), sendo geralmente associado, mas não restrito, a um hospedeiro específico (Arumugam et al. 2011). Diferentes técnicas de genotipificação têm sido utilizadas para classificar este microrganismo, como o RAPD (Lee et al. 2011) e MLST (Silva et al. 2012, Bisgaard et al. 2013). Dada a importância econômica desta bactéria, principalmente em sistemas de produção de suínos, seus fatores de virulência têm sido amplamente estudados.

A toxina PMT está geralmente associada a amostras toxigênicas e outras bactérias, como a *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*), responsáveis por causar rinite atrófica nos suínos (Bäckström et al. 1988, Ahn et al. 2008). São descritos também, os genes *exxB/tonBe hgbA* envolvidos no sequestro de ferro, os genes codificadores da neuraminidase (*nanB* e *nanH*), fímbria do tipo IV e proteínas de membrana externa (OMP e *Oma87*) (Ruffolo & Alder 1996, Bethe et al. 2009). Além de dez genes associados à utilização de L-fucose, responsável pelo metabolismo de carboidratos, fundamentais aos processos bacterianos para aquisição de energia em ambiente de baixa disponibilidade de nutrientes, como o trato respiratório (Johnson et al. 2013).

Os genes do locus *tad* são essenciais para formação de biofilme em vários gêneros, como *Aggregatibacter*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Yersinia* e *Caulobacter* (Tomich et al. 2007). Com seu locus gênico composto por *flp1*, *flp2*, *tadV*, *rcpC*, *rcpA*, *rcpB*, *tadZ*, *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG* ou apenas *flp-rcp-tad*, têm sido implicado na patogênese de diversos gêneros bacterianos (Tomich et al. 2007). Schreiner et al. (2003) relatam que a mutação nos genes *flp-1* e *tadA* causaram a perda na virulência de amostras patogênicas oriundas de humanos, da região da cavidade oral. Harper et al. (2006) e Tang et al. (2009) citam o *tadD* como um fator de patogenicidade crucial à aderências em substratos (tecidos ou materiais) e formação de biofilme em *P. multocida*.

O objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência de *P. multocida* em pneumonias de suínos e da microbiota de pulmões sem lesão e a ocorrência dos genes do locus *tad* nestes isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras foram coletadas de 100 pulmões com lesões macroscópicas de pneumonia (consolidação pulmonar, deposição de fibrina, pleurisia e/ou aderência) e 100 pulmões sem lesões macroscópicas em frigoríficos de Inspeção Federal entre 2010 e 2012. Os pulmões foram submetidos a exames microbiológicos para isolamento de *Pasteurella multocida* e estes foram confirmados bioquimicamente pelos testes da catalase, oxidase, urease, *Triple Sugar Iron* (TSI) e os açúcares: glicose, sacarose, lactose, maltose e manitol (Quinn et al. 1994).

**Extração de DNA e PCR específico para *P. multocida* e sorotipos dos isolados.** Para confirmação do gênero, espécie e sorotipos capsulares através do PCR foram utilizados os seguintes genes: *kmt1* (*P. multocida*), *hyaD-hyaC* (sorotipo A), *bcbD* (sorotipo B), *dcbF* (sorotipo D), *ecbJ* (sorotipo E) e *fcB* (sorotipo F). O DNA foi extraído, seguindo o protocolo de fenol/clorofórmio (Sambrook & Russel 2004). A PCR específica para o gene *kmt1* e para os sorotipos foram realizadas a partir do proposto por Townsend et al. (2001) (volume final de 20µl, 20ng de DNA, 2.4mM de MgCl<sub>2</sub>, 1x de Taq Buffer com 50mM de KCl, 1,0µM de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de dNTPs e 1 U Taq DNA polimerase). As ampliações para todos os genes foram realizadas em termociclador (BIO-RAD MyCyclerThermalCycler), com desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos para desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 54°C e 60 segundos de extensão a 72°C, seguidos por um ciclo de extensão final por 7 minutos a 72°C. Como controle positivo foi utilizado o isolado M135/10 de *P. multocida*, confirmado por sequenciamento do gene *kmt1* e genotipado por MLST (*Multilocus Sequence Typing*) com as sequências depositadas no PubMLST (<http://pubmlst.org/pmultocida>) (Silva et al. 2012), e como controle negativo, água ultrapura. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel agarose 2,0%, corados com *Gel Red*<sup>™</sup> (Biotium<sup>®</sup>), a 10 V por cm, e observados em ChemiDoc<sup>™</sup> XRS utilizando o software ImageLab<sup>™</sup>. Como marcador de massa molecular utilizou-se o padrão 100 pb DNA Ladder<sup>™</sup> (Fermentas<sup>®</sup>). Os oligonucleotídeos utilizados e tamanho dos amplicons encontram-se no Quadro 1.

**PCR para os genes *tad*.** Para análise da presença dos genes *tad*, foram desenhados sete pares de oligonucleotídeos, sendo o *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG* (Quadro 3). Todos os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência da amostra de *P. multocida* PM36950 (GenBank CP003022) utili-

**Quadro 1. Identificação, sequências e altura de amplificação dos sorotipos de *Pasteurella multocida***

Sorogrupo	Gene	Sequência 5' 3'	Tamanho de amplificação
Todos	<i>kmt1</i>	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAACGAACCTCGCCAC	460
A	<i>hyaD-hyaC</i>	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1.044
B	<i>bcbD</i>	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	760
D	<i>dcbF</i>	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657
E	<i>ecbJ</i>	TCCGCAGAAAATATTGACTC GCTTGCTGCTTGATTTTGTG	511
F	<i>fcB</i>	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG TTCCGCCGTCAAATTACTCTG	851

**Quadro 3. Sequência de oligonucleotídeos dos genes *tad* e seus respectivos tamanhos de amplicons**

TAD	Sequencia 5' 3'	Tamanho de amplificação
TAD A1	Foward: GGTCGCATCAGGAGACTAT Reverse: AGGCGAAATTACGATGCAAG	172 pb
TAD B	Forward: TTGCCTAATTGTCCCGTTA Reverse: TGGAAAGTTAGGGCAATACCG	150 pb
TAD C	Forward: GTGACCAAAAAGCTTCACACG Reverse: GGGATTGCAGTTTTGCTGAT	221 pb
TAD D	Foward: TCGCAACCCTAATCGACAA Reverse: GCGGCTTTAAAACAAGTGGC	1274 pb
TAD E	Foward: TGGATTTCGTCCCAAGAGAAC Reverse: ATCTCTCTACGGGGAGTTCG	195 pb
TAD F	Foward: GATCTAATCAGCCCGTTGA Reverse: TATCATTGGCGATTGTACGC	183 pb
TAD G	Foward: AACTTGCCCAATTGTTCTCG Reverse: CCTTCTGGTGGACTTCTGC	224 pb

zando a ferramenta primer-BLAST™ (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

A amplificação dos genes através da PCR foi realizada em um volume final de 20µl, contendo 30ng de DNA, 20pmol de cada oligonucleotídeo, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1x de taq buffer com 50mM de KCl, 0,2mM de cada dNTP e água ultra pura q.s.p. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel agarose 2,0%, corados com *Gel Red™* (Biotium®), a 10 V por cm e observados em ChemiDoc™ XRS utilizando o software ImageLab™.

**Análise estatística.** Foi utilizada a análise estatística de regressão logística multivariada para verificar associação entre as variáveis sorotipo, presença de lesão pulmonar e presença dos genes do lócus *tad* nos isolados de *P. multocida*. As variáveis com interações significativas ( $p < 0,05$ ) foram posteriormente analisadas pelo teste exato de Fisher. Todas as análises foram realizadas pelo programa R versão 2.14.2 (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria).

## RESULTADOS

Foram obtidos 70 isolados, identificados pelos testes bioquímicos e amplificação do gene *kmt1* específico para *Pasteurella multocida* (Quadro 2). Destes, 67 (67/70) isolados eram de pulmões que apresentavam alterações macroscópicas e apenas três isolados (3/70) foram de pulmões sem lesões. Na tipificação capsular, 85,71% (60/70) das amostras de *P. multocida* foram positivas para o sorotipo capsular A e 14,29% para o sorotipo D (10/70).

Na análise da ocorrência dos genes do lócus *tad* observou-se que todos os isolados foram positivos para os genes *tadA*, *tadB* e *tadC*. Os genes *tadD*, *tadE*, *tadF* e *tadG*, entretanto, apresentaram variações na ocorrência com valores de 85,71%, 97,14%, 97,14%, e 98,57%, respectivamente.

A análise estatística através da regressão logística multivariada mostrou associação entre sorotipo, presença de lesão e ocorrência dos genes *tad* em isolados de *P. multocida*. Ocorreu também associação entre a presença de lesão e o isolados do sorotipo capsular A ( $p = 0,02$ ), sendo as amostras isoladas de pulmões sem lesões somente do sorotipo D.

A frequência de ocorrência dos genes do lócus *tad* também apresentou associação com o sorotipo capsular. O gene *tadD* esteve ausente nos dez isolados do sorotipo D. A ocor-

rência dos genes *tadE*, *tadF* e *tadG* também foi menor em isolados do sorotipo D, sendo estatisticamente significativa a ausência dos genes *tadE* ( $p = 0,018$ ) e *tadF* ( $p = 0,018$ ).

Com relação à ocorrência dos genes do lócus *tad* em isolados de pulmões com e sem lesões, observou-se que os genes *tad* estavam presentes em 100% dos isolados de *P. multocida* de pulmões com lesões, exceto o *tadD* (Figura 1). Já nos três isolados provenientes de pulmões sem lesão, os genes *tadA*, *tadB*, *tadC* estavam presentes em 100% (3/3) das amostras (Fig.1). Os genes *tadE*, *tadF* e *tadG* estavam presentes em 33,3% (1/3), 33,3% (1/3) e 66,6% (2/3), respectivamente, nos isolados. No caso do gene *tadD*, todos os isolados (0/3) foram negativos (Fig.1).

Pela análise do teste de Fisher foi observada a associação existente entre a presença de lesão e a ocorrência de genes *tadD* ( $p = 0,002$ ), *tadE* ( $p = 0,001$ ) e *tadF* ( $p = 0,001$ ) nos isolados analisados.

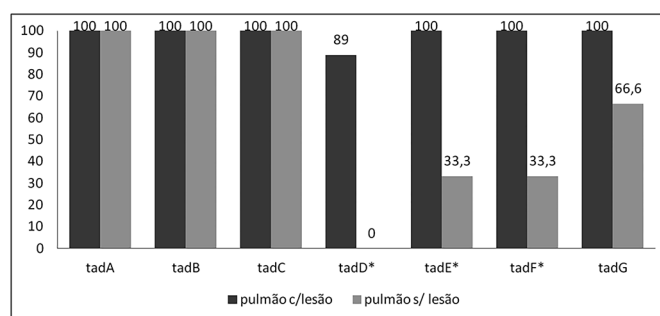


Fig.1. Percentual de ocorrência de genes *tad* em isolados de *P. multocida* de pulmões com e sem lesões macroscópicas. Os genes marcados com \* apresentam diferença na ocorrência nos pulmões com e sem lesões ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Pasteurelose é uma das doenças mais comuns em suínos de crescimento e terminação em todo o mundo. Amostras toxigênicas, capazes de desencadear a rinite atrofica progressiva (RAP), são associadas principalmente aos sorotipos D (Amigot et al. 1998). Os isolados de pneumonia geralmente são não toxigênicos e podem apresentar os tipos capsulares A e D, sendo o sorotipo A o mais prevalente (Ewers et al. 2006, Bethe et al. 2009). Destacam-se os maiores índices encontrados em pulmões com lesões de pneumonia associados ao sorotipo A, em vários países como o Reino Unido (82,2%), Alemanha (53,4%) e Coréia do Sul (56,6%) (Davies et al. 2003, Ahn et al. 2008, Bethe et al. 2009). Tang et al. (2009) relataram a presença do sorotipo capsular A em apenas 39,5% das amostras de um total de 233 isolados de *P. multocida* obtidos de suínos com doença clínica respiratória, na China. Ainda neste mesmo estudo, o sorotipo D foi identificado em 54,9% dos isolados. Provavelmente esses valores se devem ao fato de neste estudo terem sido avaliados isolados de vários locais do trato respiratório, sem descrever a origem tecidual da amostra, ao contrário dos demais estudos que analisaram apenas os de origem pulmonar. No Brasil os índices do sorotipo A encontrados variam entre 89,4% (Moreno et al. 2003) a 95,5% (Borowski et al. 2002), índices similares encontrados em nosso estudo (85,71%).

**Quadro 2. Isolados de *Pasteurella multocida* com resultado de sorotipo capsular, ocorrência de lesão e presença dos genes *tad***

Isolado	Sorotipo	Lesão	<i>tadA</i>	<i>tadB</i>	<i>tadC</i>	<i>tadD</i>	<i>tadE</i>	<i>tadF</i>	<i>tadG</i>
M305/09	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M135/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M142/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M150/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M152/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M153/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M154/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M155/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M158/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M159/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M160/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M161/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M162/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M163/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M164/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M165/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M166/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M167/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M171/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M173/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M174/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
M175/10	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
RS/G09/02	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MT/G04/03	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MG/F01/01	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MG/F01/02	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MG/F01/03	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MG/F08/01	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MS/F08/01	D	Presente	+	+	+	-	+	+	+
MTF04/01	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF02/02	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF03/02	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF06/02	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTG05/01	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF01/01	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF03/01	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF01/02	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF02/01	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTF03/02	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
MTG04/02	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
1B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
2B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
3B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
6B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
11B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
12B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
13B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
14B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
15B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
16A	D	Ausente	+	+	+	-	+	+	+
16B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
17A	D	Ausente	+	+	+	-	-	-	-
17B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
18A	D	Ausente	+	+	+	-	-	-	+
20B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
25B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
26B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
27B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
28B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
31B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
32B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
33B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
35B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
41B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
43B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
44B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
45B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
46B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
47B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+
48B	A	Presente	+	+	+	+	+	+	+

A capacidade de formar biofilme aumenta a patogenicidade bacteriana, pois impede a ação de antimicrobianos e do sistema monocítico fagocitário (Donlan & Conserton 2002). O locus *tad* pertence ao grupo das adesinas e é composto por 14 genes, sendo eles o *flp-1-flp-2-tadV-rcpCAB-tadZABCDEFG*, sendo responsável pela aderência e formação de biofilme em várias espécies patogênicas, como o *Actinobacillus actinomycetecomytans*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bordetella pertussis* (Kachlany et al. 2000, Tomich et al. 2007, Bernard et al. 2009, Schilling et al. 2010).

Ao menos 12 genes do locus *tad* são requeridos para a formação de todos os fenótipos relacionados à aderência, incluindo a produção do *Flp pili*, morfologia rugosa das colônias, auto agregação e formação de biofilme (Tomich et al. 2007). Harper et al. (2006) citam que as fímbrias e adesinas são fundamentais para a aderência em células do hospedeiro e que o *tadD* atua codificando um aparato de secreção requerido para a formação do *Flp pili*. Fuller et al. (2000) demonstraram que mutações no gene *tadD* de *P. multocida* tornaram a virulência da bactéria atenuada. Isto poderia explicar nossos resultados, onde o gene *tadD* foi encontrado na maioria das amostras oriundas de pulmões com lesão 89,55% (60/67) e estava ausente nas amostras sem lesão (0/3), apesar de um pequeno número dessas amostras, devido à baixa prevalência de *P. multocida* na microbiota dos pulmões sem lesão.

Tang et al. (2009) analisando genes de virulência em 233 isolados de *P. multocida* de lesões pulmonares e rinite atrófica obtiveram 101 (43,3%; 101/233) dos isolados positivos para o gene *tadD*. Neste estudo, ficou evidenciada uma correlação estatística entre o sorotipo capsular A e o gene *tadD*.

Alguns autores demonstraram que mutações nos genes *tadE* e *tadF* em *A. actinomycetecomitans* ocasionam uma diminuição na produção de pili e incapacidade de adesão em superfície (Kachlany et al. 2000, Wang et al. 2003, Tomich et al. 2006). Nos isolados do nosso estudo apenas dois não apresentaram amplificação para esses genes (17A e 18A), sendo ambos de pulmões sem lesão, indicando que possa ter ocorrido uma baixa capacidade de fixação no epitélio pulmonar por parte destes.

Em *P. multocida* a ocorrência de genes do locus *tad* poderia facilitar a adesão da bactéria nas células hospedeiras e ser um fator de virulência importante na ocorrência de pneumonia em suínos. Essas novas variantes genéticas provavelmente originaram-se da necessidade de adaptação da bactéria ao hospedeiro, através de trocas horizontais de materiais genéticos, conhecido como “ilha genômica” (Hacker & Kaper 2000). Análises das  $\gamma$ -proteobactérias, incluindo a família Pasteurellaceae indicam que a transferência horizontal dessas ilhas pode ocorrer entre famílias próximas e estudos mostram que existe uma grande dispersão entre os procariotos (Planet et al. 2003).

## CONCLUSÃO

Os genes *tadD*, *tadE* e *tadF* importantes na adesão e formação de biofilme em *P. multocida* estão associados a presença de lesões pulmonares em suínos.

**Agradecimentos.** - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemat) pelo financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS

- Ahn K.K., Lee Y.H., Ha Y., Kim D., Chae S., Kim C.H., Lee J.H., Kim S.H. & Chae C. 2008. Detection by in-situ hybridization of *Pasteurella multocida* toxin (*toxA*) gene in the lungs of naturally infected pigs. J. Comp. Pathol. 139(1):51-53.
- Amigot J.A., Torremorell M. & Pijoan C. 1998. Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 10:169-173.
- Arumugam N.D., Ajam N., Blackall P.J., Asiah N.M., Ramlan M., Maria J., Yuslan S. & Thong K.L. 2011. Capsular serotyping of *Pasteurella multocida* from various animal hosts - a comparison of phenotypic and genotypic methods. Trop. Biomed. 28(1):55-63.
- Bäckström L.R., Brim T.A. & Collins M.T. 1988. Development of turbinate lesions and nasal colonization of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* during long term exposure of healthy pigs affected by atrophic rhinitis. Can. J. Vet. Res. 52:23-29.
- Bernard C.S., Bordi C., Termine E., Filloux A. & Bentzmann S. 2009. Organization and PprB-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa* *tad* locus, involved in *Flp pilus* biology. J. Bacteriol. 191(6):1961-1973.
- Bethe A., Wieler L.H., Selbitz H.J. & Ewers C. 2009. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. Vet. Microbiol. 139(1/2):97-105.
- Bisgaard M., Petersen A. & Christensen H. 2013. Multilocus sequence analysis of *Pasteurella multocida* demonstrates a type species underdevelopment. Microbiol. 159:580-590.
- Borowski S.M. 2001. Pasteurelose pulmonar: uma atualização. Anais X Congresso da Abraves, Porto Alegre, RS, p. 8. (Resumo)
- Borowski S.M., Ikuta N., Lunge V., Fonseca A., Marques E. & Cardoso M. 2002. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. Pesq. Vet. Bras. 22(3):97-103.
- Boyce J.D., Harper M., Wilkie I.W. & Adler B. 2010. *Pasteurella*, p.325-340. In: Prescott J.F. (Ed.), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, Ames.
- Collins C., Flanagan B. & Henning J.S. 2012. An atypical presentation of a *Pasteurella multocida* infection following a cat bite: a case report. Cutis 89(6):269-72.
- Davies R.L., MacCorquodale R., Baillie S. & Caffrey B. 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. J. Med. Microbiol. 52:59-67.
- Donlan R.M. & Conserton J.W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15(2):167-193.
- Ewers C., Lübke-Becker A., Bethe A., Kiebling S., Filter M. & Wieler L.H. 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet. Microbiol. 114:304-317.
- Fuller T.E., Kennedy M.J. & Lowery D.E. 2000. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microbiol. Pathogens 29:25-38.
- Hacker J. & Kaper J.B. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Rev. Microbiol. 54:641-79.
- Harper M., Boyce J.D. & Adler B. 2006. Minireview *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur FEMS Microbiol. Lett. 265:1-10.
- Johnson T., Abrahante J.E., Hunter S.S., Hauglund M., Tatum F.M., Maheswaran S.K. & Briggs R.E. 2013. Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity. BMC Microbiol. 14(3):106.
- Kachlany S.C., Planet P.J., Bhattacharjee M.K., Kollia E., Desalle R., Fine D.H. & Figsurski D.H. 2000. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetecomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. J. Bacteriol. 182(21):6169-6176.

- Lee K.E., Jeoung H.Y., Lee J.Y., Lee M.H., Choi H.W. & Chang K.S. 2011. Phenotypic characterization and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* isolated from Korean pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 74(5):567-573.
- Moreno A.M., Baccaro M.R., Ferreira A.J. & De Castro A.F.P. 2003. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1743-1746.
- Nagata H., Yamada S., Uramaru K., Kiyasu Y. & Kano N. 2013. Acute cholecystitis with bacteremia caused by *Pasteurella multocida*. *Surg. Infect.* 14:1-3.
- Nguefack S., Moifo B., Chiabi A., Mah E., Bogne J.B., Fossi M., Fru F., Mbonda E. & Djientcheu V.P. 2014. Méningite à *Pasteurella multocida* compliquée d'abcès cérébral. *Arch. Pediatr.* 3571:1-3.
- Planet P.J., Kachlany S.C., Fine D.H., DeSalle R. & Figurski D.H. 2003. The widespread colonization island of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Nat. Gen.* 24(2):193-198.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe, London.
- Ribeiro W.L.C., Pinheiro A.R.A., Evangelista J.N.B. & Sales R.O. 2012. Rinite atrofica e sua importância na indústria suinícola: uma revisão. *Revta Bras. Hig. Sanid. Anim.* 6(1):21-35.
- Ruffolo C.G. & Alder B. 1996. Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the oma87 gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-Kilodalton outer membrane antigen. *Infect. Immun.* 64(8):3161-3167.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2004. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.5.65-5.67.
- Schilling J., Wagner K., Seekircher S., Greune L., Humberg V., Schmidt M.A. & Heussipp G. 2010. Transcriptional activation of the tad type IVb pilus operon by PypB in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 192(14):3809-3821.
- Schreiner H.C., Sinatra K., Kaplan J.B., Furgang D., Kachlany S.C., Planet P.J., Perez B.A., Figurski D.H. & Fine D.H. 2003. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *PNAS* 100(12):7295-7300.
- Silva G.F.R., Brandão L.N.S., Paula D.A.J., Pescador C.A., Chitarra C.S., Carvalho R.C.T., Nakazato L. & Dutra V. 2012. Characterization using Multilocus Sequence Typing and virulence factors of *Pasteurella multocida* from pigs with pneumonia in states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Sci. Res.* 3(1):55-59.
- Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q. & Chen H. 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 47(4):951-958.
- Tomich M., Planet P.J. & Figurski D.H. 2007. The *tad* locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev.* 5:363-375.
- Tomich M., Fine D.H. & Figurski D.H. 2006. The *tadV* protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a novel aspartic acid prepilin peptidase required for maturation of the Flp1 pilin and *tadE* and *tadF* pseudopilins. *J. Bacteriol.* 188(19):6899-6914.
- Townsend K., Boyce J.D., Chung J.Y., Frost A.J. & Alder B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Clin. Microbiol.* 39(3):924-929.
- Wang Y., Ha U., Zeng L. & Jin S. 2003. Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:95-101.