

Pesquisa de quatro genes associados à virulência e caracterização molecular por PCR-RFLP de cepas de *Pasteurella multocida* de origem aviária

Camila Neves de Almeida ¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes ²
¹ Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
² Professor adjunto, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INTRODUÇÃO

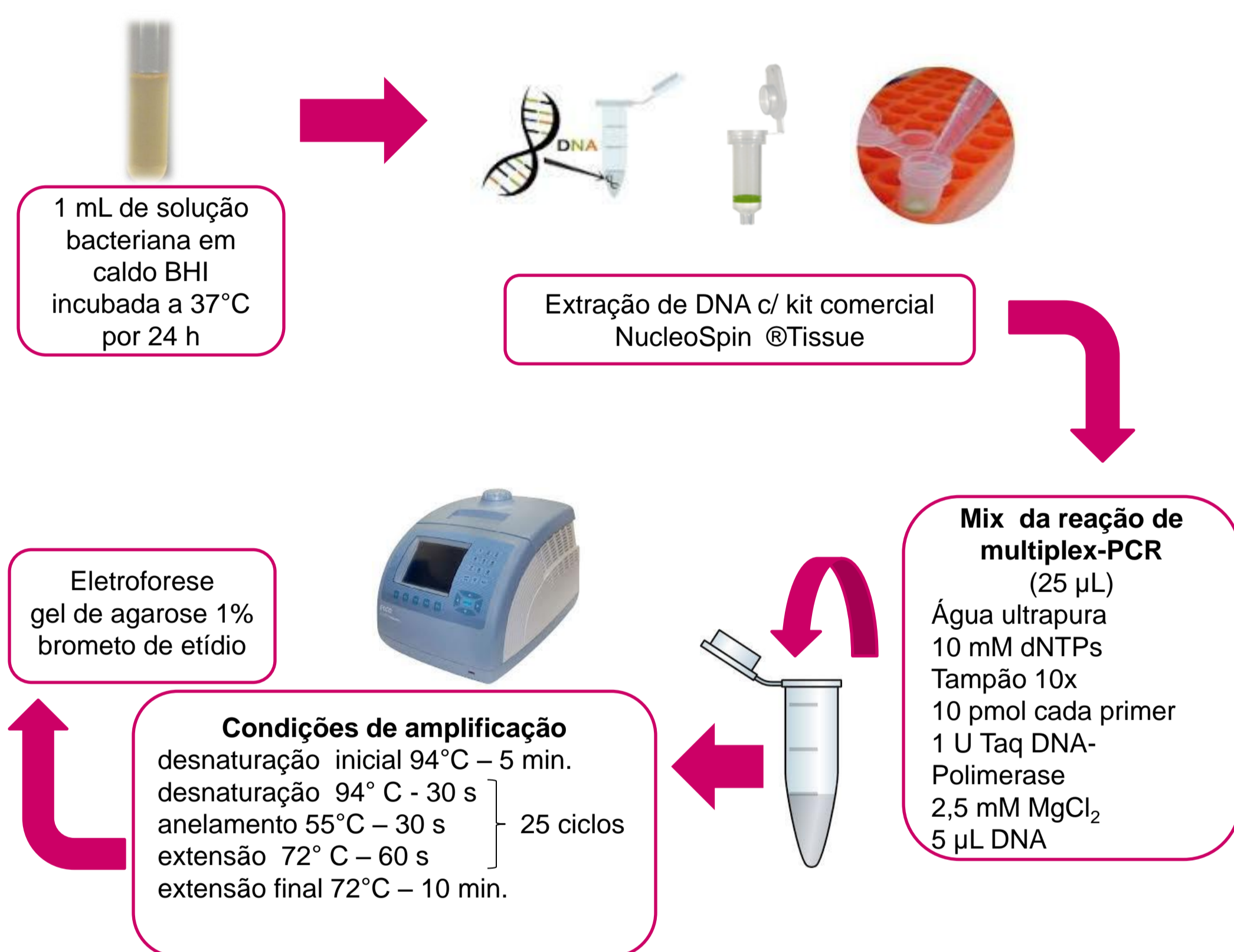
A Cólera Aviária (CA) causada pela bactéria *Pasteurella multocida* apresenta diferentes graus de manifestação clínica, possivelmente devido ao desequilíbrio da relação entre hospedeiro e bactéria, assim como pela presença de fatores de virulência que diferem os microrganismos. Além disto, isolados originários de surtos distintos podem ser caracterizados através de técnicas moleculares. As principais estruturas associadas à virulência em cepas de *P. multocida* são a cápsula e o lipopolissacarídeo (LPS) (HARPER et al., 2006). Entretanto, outros diversos fatores podem ser relacionados à capacidade do agente em infectar um hospedeiro. Alguns exemplos são os genes que codificam proteínas externas de membrana (*omph*; *oma87*, *ompA*), genes que codificam enzimas do metabolismo bacteriano, como sialidasas (*nanH*, *nanB*), dismutases (*sodA*, *sodC*) e proteínas associadas ao transporte e metabolismo do ferro (*hgbA*, *hgbB*, *exBD-tonB*) (EWERS et al., 2006; BETHE et al., 2009). A superfície celular de bactérias Gram-negativas apresenta uma série de proteínas de membrana externa (OMPs) que são importantes para a interação com o hospedeiro, como a proteína *omph*. Os perfis de OMPs observados em *P. multocida* são variáveis e estas diferenças podem ser utilizadas em estudos de caracterização molecular. Entre as técnicas disponíveis, o PCR-RFLP é largamente utilizado para a análise do polimorfismo dentro de um segmento gênico (HATFALUDI et al., 2010).

OBJETIVO

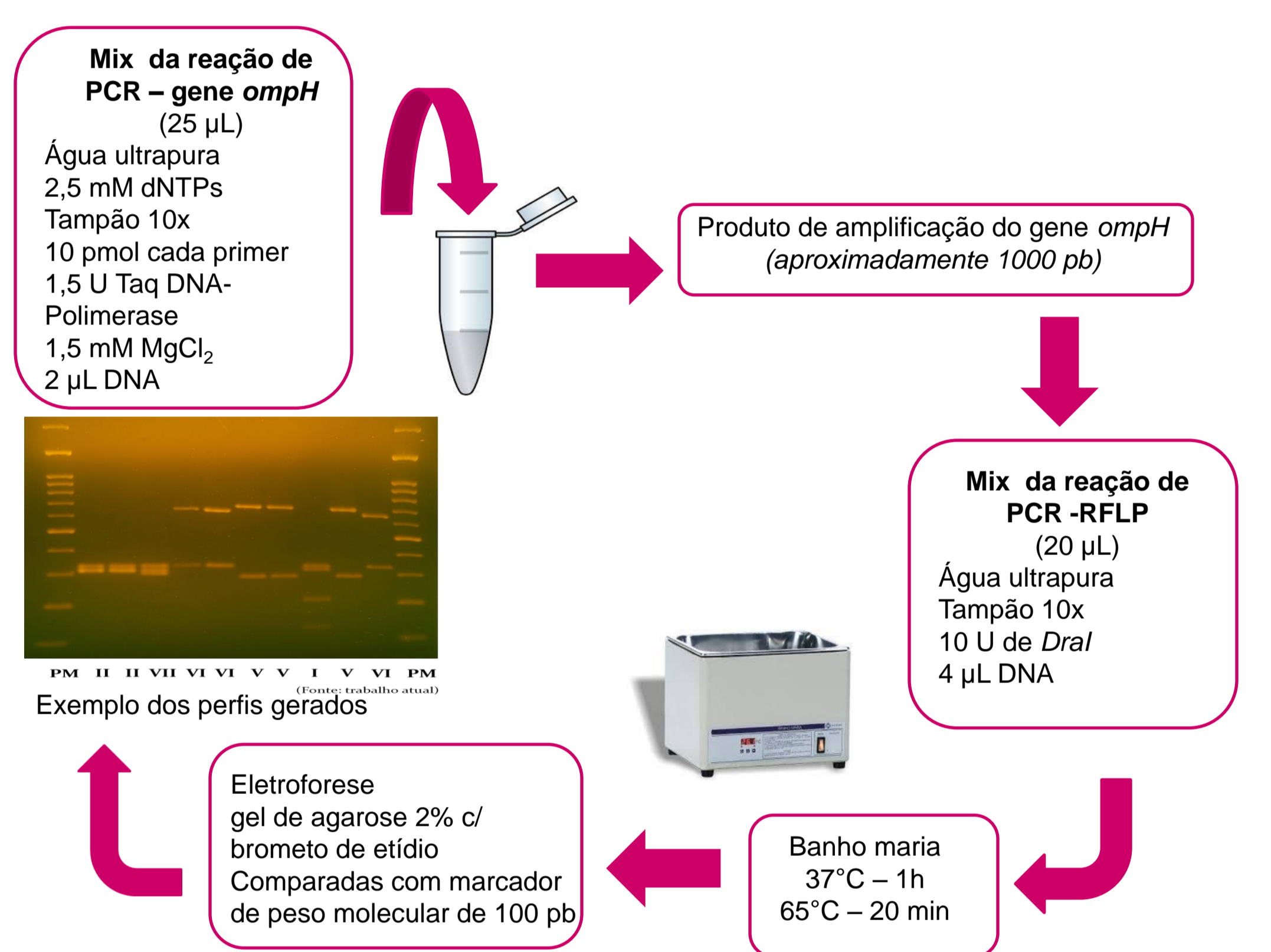
O objetivo deste trabalho foi pesquisar 04 genes de virulência (*oma87*, *hgbB*, *nanB*, *sodC*) em 56 isolados de CA provenientes da região sul do Brasil através do emprego de um protocolo de multiplex-PCR e caracterizar as cepas por PCR-RFLP a partir da análise do gene *omph*.

MATERIAIS E MÉTODO

Pesquisa dos genes de virulência *oma87*, *hgbB*, *nanB*, *sodC*



Caracterização molecular por PCR-RFLP



RESULTADOS

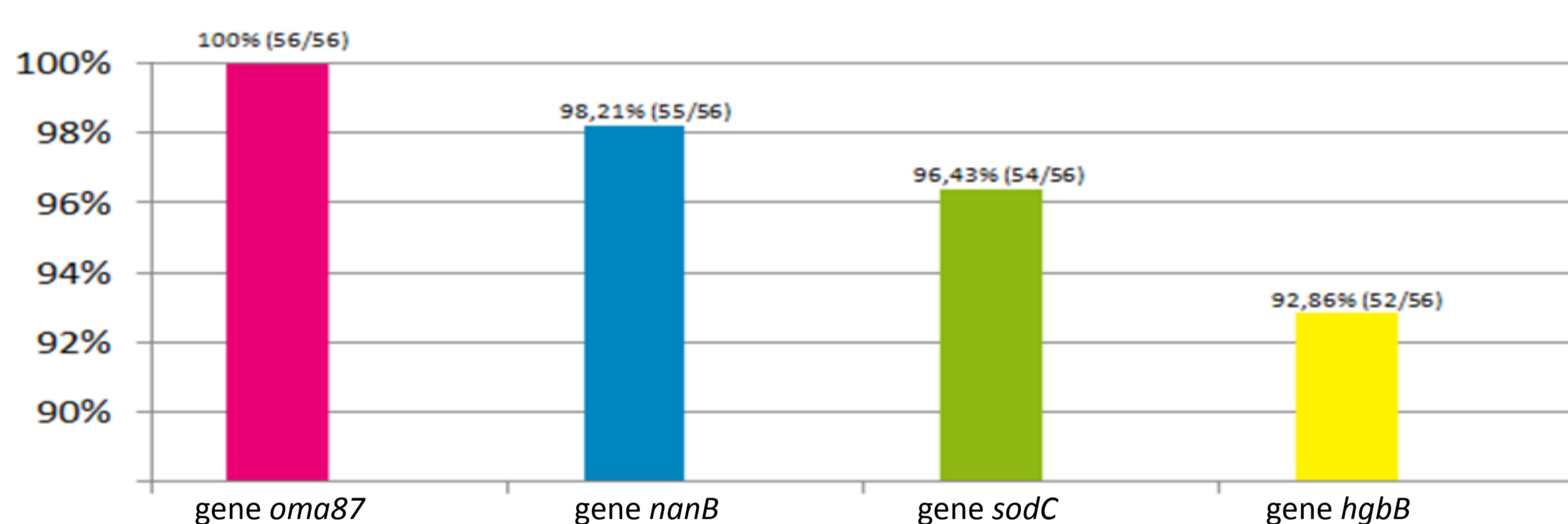


Gráfico 1: Frequência relativa e absoluta dos genes de virulência *oma87*, *nanB*, *sodC* e *hgbB* detectados por PCR de 56 cepas de *P. multocida*

Tabela 1: Perfis de PCR-RFLP (I – VII) gerados a partir da clivagem do produto de amplificação do gene *omph* de aproximadamente 1000 pb com a enzima *DraI*

Grupo genético	Número de cepas	Frequência relativa (%)	Perfil (pb)
I	7	12,28	131, 216, 314, 337
II	24	42,11	314, 317, 337
III	2	3,51	225, 750
IV	2	3,51	430, 530
V	10	17,54	290, 693
VI	5	8,77	337, 631
VII	6	12,28	305, 314, 337

DISCUSSÃO

Ainda são poucos os trabalhos que têm como objetivo a detecção e a determinação de padrões genéticos de virulência em *P. multocida*, especialmente quando relacionados às cepas isoladas de aves (BETHE et al., 2009; TANG et al., 2009). Os resultados obtidos na detecção dos genes *oma87*, *nanB*, *sodC* e *hgbB* foram semelhantes aos observados em outros estudos citados na literatura (DAVIES et al., 2004; EWERS et al., 2006; BETHE et al., 2009). Os isolados foram agrupados em sete diferentes perfis através da caracterização molecular por PCR-RFLP. Os perfis II e V foram predominantes, sendo identificados, em 42,11% e 17,54% das cepas respectivamente. Pesquisas baseadas na análise e na discriminação do gene *omph* ou na estrutura do lipopolissacarídeo são alguns exemplos de trabalhos que empregaram a técnica de PCR-RFLP (TSAI et al., 2011) em *P. multocida* com sucesso (JABBARI et al., 2005; SAI et al., 2011; SELLYEI et al., 2013). Os métodos moleculares apresentam melhor destaque na tipificação de *P. multocida* nos últimos anos, devido as limitações inerentes aos testes de biotipificação através da fermentação de carboidratos (MUHAIRWA et al., 2001) e através dos testes sorológicos (CARTER, 1955; RHOADES & RIMLER, 1987). De maneira semelhante, Jabbari et al. (2005) realizaram a amplificação de um fragmento do gene *omph* e a posterior digestão com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *CfoI*, conseguindo classificar os 25 isolados de *P. multocida* analisados em cinco diferentes perfis. Da mesma forma, no atual trabalho todas as 56 cepas foram classificadas em diferentes perfis.

CONCLUSÃO

Como todas as cepas foram isoladas de casos clínicos de CA, foram encontradas altas frequências dos genes estudados, possivelmente por se tratarem de cepas mais virulentas. O protocolo PCR-RFLP foi capaz de caracterizar os isolados e consiste em uma alternativa na análise da diversidade das cepas em estudos de epidemiologia molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETHE, A. et al. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Veterinary Microbiology*, v. 139, p. 97-105, out. 2009.
 CARTER, G. R. Studies on *Pasteurella multocida* I. A haemagglutination test for the identification of serological types. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, EUA, v. 16, p. 481-484, jul. 1955.
 DAVIES, R. L.; MACCORQUODALE, R.; REILLY, S. Characterization of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Veterinary Microbiology*, v. 99, 2004. p. 145-158.
 EWERS, C. et al. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*, v. 114, p. 304-317, já. 2006.
 HARPER, M.; BOYCE, J. D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, Malden, EUA, v. 265, p. 1-10, dez. 2006.
 HATFALUDI, T. et al. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, v. 144, p. 1-17, jul. 2010.
 JABBARI, A. R.; ESMAELIZADEH, M. Molecular typing of avian *Pasteurella multocida* isolates by PCR-RFLP of *omph* gene. *Iranian Journal of Biotechnology*, Teerã, v.3, n.2, p. 99-103, abr. 2005.
 MUHAIRWA, A. P. et al. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Veterinary Microbiology*, v. 78, p. 139-153, jan. 2001.
 RHOADES, K. R.; RIMLER, R. B. Fowl cholera. In: ADLAM, C.; RUTTER, J. M. (Ed.). *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press Limited, 1987. p. 95-144.
 SELLYEI, B.; IVANICS, E.; MAGYAR, T. Characterisation of avian *Pasteurella multocida* strains with PCR-RFLP analysis of the *omph* gene. *Acta Veterinaria Hungarica*, Budapeste, v. 61, n.1, p. 1-8, mar. 2013.
 TANG, X. et al. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in Cinha. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 47, n. 4, p. 951-958, abr. 2009.
 TSAI, Y. C. et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, n.3, p. 543-546, maio. 2011.