



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Classificação fenotípica de isolados de Pasteurella multocida em casos de Cólera Aviária e detecção de gene associado à captação de ferro através de PCR
Autor	SUELLE VENCATO RODRIGUES
Orientador	CARLOS TADEU PIPPI SALLE

Os microrganismos da família *Pasteurellaceae* estão envolvidos em várias doenças clínicas, principalmente naquelas de manifestação respiratória. Entre estes agentes, destaca-se a bactéria *Pasteurella multocida*, causadora de diversas enfermidades de grande impacto econômico nos animais de interesse zootécnico, incluindo-se a Septicemia Hemorrágica em bovinos, a Rinite Atrófica em suínos e, especialmente, a Cólera Aviária (CA) nas aves. Apesar de a CA caracterizar-se pelo desenvolvimento de uma enfermidade septicêmica que resulta em alta mortalidade, surtos com ausência de sinais clínicos, assim como a forma crônica da doença, também pode ocorrer. A diversidade da manifestação clínica é possivelmente justificada pela grande variação fenotípica e genotípica dos isolados obtidos em casos clínicos. Amostras de *P. multocida* podem ser classificadas em três diferentes subespécies e em quatorze distintos biovars através de testes bioquímicos. Da mesma forma, a presença de fatores de virulência que propiciam a colonização e que subvertem a fisiologia hospedeira diferem os microrganismos patogênicos de uma mesma espécie. O objetivo deste trabalho foi determinar fenotipicamente a subespécie e o biovar de 20 cepas de origem aviária isoladas de casos clínicos de CA, assim como pesquisar o gene *exBD-tonB*, relacionado à captação de ferro e associado à virulência em *P. multocida*, através da técnica de PCR. Inicialmente, as amostras puras de *P. multocida* estocadas a -70°C foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Cada cepa foi semeada em ágar sangue, adicionado de 5% de sangue ovino desfibrinado, e em ágar MacConkey. Uma colônia presente no ágar sangue foi selecionada para a realização dos testes fenotípicos e classificada em uma das três subespécies descritas na literatura (*multocida*, *septica* e *gallicida*) a partir dos resultados de fermentação dos carboidratos sorbitol e dulcitol. Cada cepa também foi classificada em um dos 14 biovars estabelecidos de acordo com a sua habilidade em fermentar os carboidratos sorbitol, dulcitol, maltose, xilose, trehalose, lactose e na produção da enzima ornitina descarboxilase. Para a realização da PCR, o DNA das amostras foi extraído utilizando-se um kit comercial. Para cada reação de amplificação foi preparado um mix de reagentes (25 μL) composto por água ultrapura, solução tampão 10X, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (DNTPs) a 10 mM, 10 pmol de primers específicos, cloreto de magnésio (MgCl_2) a 50 mM, 1 unidade de enzima Taq DNA-Polimerase e 2 μL de DNA extraído. A eletroforese dos produtos amplificados foi desenvolvida em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. A subespécie *multocida* foi identificada em 17 das 20 amostras analisadas (85%), duas cepas foram pertencentes à subespécie *septica* (10%) e somente um exemplar classificado como *gallicida* (5%). Entre os biovars, o tipo 3 e o tipo 1 foram predominantes, sendo identificados em 7 (35%) e 5 (25%), respectivamente, dos isolados avaliados. O gene *exBD-tonB* foi detectado em 100% das amostras, resultado previsto por tratar-se de isolados de casos clínicos e porque o complexo TonB é responsável pela força próton motiva necessária para internalizar ferro no espaço periplasmático nos diferentes mecanismos bacterianos de captação. As três subespécies de *P. multocida* já foram identificadas em surtos de CA, contudo a subespécie *multocida* apresenta maior prevalência, assim como o biovar do tipo 3. Estudos futuros associando-se a classificação fenotípica em diversos biovars com a utilização de testes de tipificação molecular e com a pesquisa de outros genes de virulência possibilitarão analisar a variação da patogenidade relacionada aos casos clínicos de CA.