



## COMPARAÇÃO ENTRE TIPIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Pasteurella multocida* DE SUÍNOS

**AMANDA F. AMARAL<sup>1</sup>, RAQUEL REBELATTO<sup>2</sup>, KARINE L. TAKEUTI<sup>1</sup>, CATIA S. KLEIN<sup>2</sup>, DAVID E. S. N. BARCELLOS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária (Favet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS - [amandamaralvet@hotmail.com](mailto:amandamaralvet@hotmail.com); <sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

**Resumo** - Os sorotipos A e D da *Pasteurella multocida* (Pm) estão comumente associados a casos de pneumonias e pleurites em suínos. Para a identificação desses sorotipos podem ser empregadas técnicas fenotípicas, como os testes de hialuronidase e acriflavina, e genotípica, como o PCR. Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a tipificação capsular de isolados de Pm (tipo A e tipo D) de suínos utilizando técnicas fenotípicas (testes de hialuronidase e de acriflavina) e genotípica (PCR multiplex). Foram analisados na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/SC, 86 isolados liofilizados de Pm obtidos no período de 1981 a 1997, provenientes do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Após realizado o cultivo desses isolados de Pm, 44 dos 86 foram recuperados (51,1%). Os testes fenotípicos foram então realizados, sendo 2 amostras do tipo D (4,5%), 40 amostras do tipo A (91%) e 2 amostras sem tipificação (4,5%), uma vez que tiveram resultados positivos para os testes de hialuronidase e acriflavina. No entanto, após esses isolados recuperados serem submetidos ao teste genotípico (PCR), 38 foram classificados como tipo A (86,4%) e 6 como tipo D (13,6%). Os resultados desse trabalho mostram que, em alguns casos, não existe equivalência entre a tipificação fenotípica e genotípica de Pm, neste estudo diferindo em 4/44 isolados (9%). Ainda, uma vez que o resultado do PCR é direto, sem a necessidade de interpretação por parte do executor, essa técnica se torna mais confiável.

**Palavras-chave:** bactéria; hialuronidase; acriflavina; PCR.

## COMPARISON OF PHENOTYPIC AND GENOTYPIC TYPIFICATION OF *Pasteurella multocida* ISOLATES FROM PIGS

**Abstract** – Serotypes A and D of *Pasteurella multocida* (Pm) are commonly associated with cases of pneumonia and pleuritis in pigs. In order to identify those serotypes, phenotypic techniques such as the hyaluronidase and acriflavine tests, and genotypic techniques such as PCR, can be utilized. The objective of this study was to compare the capsular typing of Pm isolates (type A and type D) amongst pigs using phenotypic (hyaluronidase and acriflavine tests) and genotypic (multiplex PCR) techniques. In this study, 86 Pm isolates from 1981 to 1997, originated from the Veterinary Research Institute Desiderius Finamor (IPVDF), were analyzed at Embrapa pigs and poultry, in Concórdia/SC. After performing the cultivation of Pm lyophilized isolates, 44 from 86 Pm isolates were recovered (51.1%). Phenotypic tests were then performed which resulted in 2 isolates of type D (4.5%), 40 isolates of type A (91%) and 2 nontypeable isolates (4.5%) because the isolates were positive for both hyaluronidase and acriflavine tests. However, after these isolates had been genotypically tested by PCR, 38 were classified as type A (86.4%) and 6 as type D (13.6%). The results of this study show that, in some cases, there is no equivalency between the phenotypic and genotypic testing methods, as proved in this study with 4 out of 44 isolates (9%) being non-equivalent. Furthermore, since the result of PCR is direct, without the need for interpretation by the performer, this test becomes more reliable.

**Keywords:** bacteria; hyaluronidase; acriflavine; PCR.



**Introdução** - A Pm é uma bactéria de distribuição mundial e possui vários hospedeiros, como humanos, pássaros e outros animais (MARKEY et al., 2013). Em suínos, é considerada um agente residente do trato respiratório superior e pode estar presente em processos de pneumonias e pleurites (HERES, 2009; REGISTER, 2012). Um dos principais fatores de virulência da Pm é sua cápsula bacteriana, utilizada para diferenciar os isolados em seis sorotipos com base na sua antigenicidade: sorotipos A, B, C, D, E e F (CARTER, 1967). Desses, os sorotipos A e D são mais comumente associados a doenças em suínos, sendo o sorotipo D mais associado com a rinite atrófica (REGISTER et al., 2012) e lesões de pneumonia (MORÉS, 2006), e o sorotipo A com pneumonias e pleurites (BOROWSKI, 2001; MORÉS, 2006). De acordo com Pijoan et al. (2006), o sorotipo A é o mais comumente isolado em casos de pneumonia, mas o sorotipo D também é encontrado. Em relação ao cultivo, a Pm é nutricionalmente fastidiosa, crescendo melhor em meios suplementados com soro ou sangue ou ainda em ágar chocolate, e não cresce em ágar MacConkey (MARKEY et al., 2013). Cartel e Rundell (1975) desenvolveram um teste para reconhecer as cepas do tipo A através da despolarização da cápsula após crescimento nas proximidades de uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de hialuronidase (satelitismo negativo). Para reconhecer as cepas do tipo D, Carter e Subronto (1973) desenvolveram uma técnica baseada na reação flocular das cepas com uso de acriflavina. No entanto, após o advento da técnica de PCR desenvolvida por Townsend et al. (2001), a tipificação capsular genotípica passou a ser o teste padrão ouro em substituição aos testes fenotípicos para muitos autores (DZIVA et al., 2008). Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar a tipificação capsular de isolados de Pm (tipo A e tipo D) de suínos utilizando técnicas fenotípicas (testes de hialuronidase e de acriflavina) e genotípica (PCR multiplex).

**Material e Métodos** - Foram analisados 86 isolados de Pm liofilizados no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), no Rio Grande do Sul, no período de 1981 a 1997. Todos os isolados foram coletados de suínos provenientes do Rio Grande do Sul enviados para o diagnóstico laboratorial de casos de campo de pleurite, pneumonia ou rinite. Inicialmente, foi realizada tentativa de recuperação dos isolados liofilizados. Para tal, cada liofilizado foi dissolvido em 3mL de ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e cultivado tanto em BHI quanto em ágar contendo 5% de sangue ovino (AS) e incubado a 37°C por 18-24h. Após incubação, foi realizada leitura das placas e, quando não se obteve crescimento de Pm, foi realizado cultivo e incubação por mais 24 h. Ao final das 48 h de incubação, os isolados puros foram estocados em BHI contendo sangue ovino (50%) e armazenados a temperatura de -70°C. Os isolados contaminados foram purificados e estocados da mesma forma. Aqueles isolados sem crescimento ou com crescimento apenas de contaminantes foram descartados. Os isolados foram classificados fenotipicamente em dois grupos, tipo A e tipo D, de acordo com seu tipo capsular, através dos testes de hialuronidase e acriflavina. Para a classificação do tipo A, foi utilizado o teste de hialuronidase descrito por Carter e Rundell (1975), que consiste em semear o isolado de Pm em ágar sangue na forma de estrias espaçadas e, em seguida, semear uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtora de hialuronidase de forma perpendicular às estrias do isolado de Pm, formando um ângulo de 90°. A placa de ágar sangue é então incubada a 37°C por 24h. São considerados isolados do tipo A, aqueles com colônias menores próximas à linha de *Staphylococcus aureus* (satelitismo negativo). Para a classificação do tipo D, foi utilizado o teste de acriflavina descrito por Carter e Subronto (1973) modificado, que consistiu em semear o isolado de Pm em um tubo com 2mL de BHI e, em seguida, incubar a 37°C por 18 a 24h. Após incubação, o tubo era centrifugado (1.500 rpm por 15 min) e retirava-se 0,5mL do sobrenadante, que era descartado. Acrescentava-se ao concentrado restante 0,5mL de uma solução de 1:1000 de acriflavina neutra. São considerados isolados do tipo D, aqueles que se autoaglutinam em até 5 min. Ainda foi realizada uma classificação genotípica por PCR multiplex para detecção dos genes de tipagem capsular *hyaD-hyaC* (tipagem capsular A), *dcbF* (tipagem capsular D) e do gene *kmt1* (espécie-específica para Pm), segundo Townsend et al. (2001).

**Resultados e Discussão** - O cultivo das amostras liofilizadas resultou na recuperação de 44 dos 86 isolados de Pm (51,1%). Após realizados os testes fenotípicos (hialuronidase e acriflavina), 2 amostras foram classificadas como tipo D (4,5%), 40 amostras como tipo A (91%) e 2 amostras como sem tipificação (4,5%), uma vez que tiveram resultados positivos para ambos os testes de hialuronidase e de acriflavina. No entanto, após esses isolados recuperados serem submetidos ao teste genotípico (PCR multiplex), 38 foram classificados como tipo A (86,4%) e 6 como tipo D (13,6%). Ou seja, houve



divergência na tipificação de 4 do total de 44 isolados (9%). A maior prevalência de Pm tipo A já era esperada, uma vez que esse sorotipo é mais comumente isolado em casos de pneumonia em suínos (PIJOAN et al., 2006). A divergência na tipificação observada nesse trabalho também foi descrita num estudo de Arumugam et al. (2011), o qual utilizou as mesmas técnicas descritas no presente trabalho.

**Conclusões** - De acordo com os resultados observados nesse trabalho, em alguns casos, não existe equivalência entre a tipificação capsular de isolados de Pm (tipo A e tipo D) de suínos realizada pelas técnicas fenotípicas (testes de hialuronidase e de acriflavina) e a técnica genotípica (PCR multiplex). Ainda, uma vez que o resultado do PCR é direto, sem a necessidade de interpretação por parte do executor, a tipificação capsular da Pm utilizando essa técnica se torna mais confiável.

### Referências Bibliográficas

- ARUMUGAM, N. D.; AJAM, N.; BLACKALL, P. J.; ASIAH, N. M.; MARIA, J.; YUSLAN, S.; THONG, K. L. 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, 2011.
- BOROWSKI, S. M. **Caracterização e estudo de virulência de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de suínos no estado do RS, Brasil.** 2001. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CARTER, G. A. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. **Advances in Veterinary Science Comparative Medicine**, v. 11, p. 321-379, 1967.
- CARTER, G. R.; SUBRANTO, P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 293-294, 1973.
- CARTER, G. R.; RUNDELL, D. W. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. **Veterinary Record**, v. 87, p. 343, 1975.
- DZIVA, F.; MUHAIRWA, A. P.; BISGAARD, M.; CHRISTENSEN, H. Diagnostic and typing options for investigation diseases associated *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 1-22, 2008.
- HERES, T. S. **Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos.** 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINAME, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2 ed, 2013, p. 307-312.
- MORÉS, M. A. Z. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos.** 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: Leman, A. (Eds) **Disease of Swine**. 9<sup>th</sup> ed., Iowa; Iowa State University Press, 2006, p. 719-726.
- REGISTER, K. B.; BROCKMEIER, S. L.; JONG, C. Pasteurellosis. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine**. 10<sup>th</sup> ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2012, p. 798-810.
- TOWNSEND, K. M.; BOYCE, J. D.; CHUNG, J. Y.; FROST, A. J.; ADLER, B. Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 924-929, 2001.