

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA
EXPRESSÃO DO OLIGOPEPTÍDEO PERMEASE DE AMOSTRAS DE *Pasteurella*
multocida ISOLADAS DE PULMÕES SUÍNOS**

Francielle Cristina Kagueyama

CUIABÁ - MT
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E
NA EXPRESSÃO DO OLIGOPEPTÍDEO PERMEASE DE ISOLADOS DE
Pasteurella multocida DE PULMÕES SUÍNOS**

Autora: Francielle Cristina Kgueyama

Orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Co-Orientadora: Profa. Dra. Valéria Dutra

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ - MT
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

K11i Kagueyama, Francielle Cristina.
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO
DE BIOFILME E NA EXPRESSÃO DO OLIGOPEPTÍDEO
PERMEASE DE ISOLADOS DE *Pasteurella multocida* DE
PULMÕES SUÍNOS / Francielle Cristina Kagueyama. -- 2017
45 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Luciano Nakazato.

Co-orientador: Valéria Dutra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Pasteurella multocida*. 2. temperatura. 3. biofilme. 4. qRT-

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA EXPRESSÃO DO OLIGOPEPTÍDEO PERMEASE DE AMOSTRAS DE *Pasteurella multocida* ISOLADAS DE PULMÕES SUÍNOS"

AUTOR : Mestranda Francielle Cristina Kagueyama

Dissertação defendida e aprovada em 09/08/2017.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutor Luciano Nakazato
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutora Caroline Argenta Pescador
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutora Maria Cristina da Silva
Instituição : INSTITUTO FEDERAL DE ENSINO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Examinador Suplente Doutor Richard de Campos Pacheco
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CUIABÁ, 09/08/2017.

DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

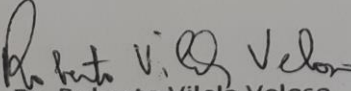
CERTIFICADO

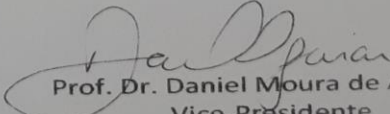
Certificamos que o Protocolo Nº 23108.137857/2016-57, sobre “Capacidade imunogênica de proteínas recombinantes de *Pasteurella multocida* obtidas através de transcritos diferencialmente expressos durante a infecção *in vivo*”, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. VALÉRIA DUTRA**/Mayara Inácio Vincenzi da Silva & Col., está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **19/05/2016**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.137857/2016-57, entitled “immunogenicity of recombinant proteins of *Pasteurella multocida* obtained from transcripts differentially expressed during infection *in vivo*”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **May 19, 2016**.

Cuiabá-MT, 19 de maio de 2016.


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus, por sempre ter iluminado e abençoado meus caminhos e decisões.

Ao meu filho Davi, minha maior motivação e inspiração para conclusão desta etapa em minha vida.

Ao meu pai Francisco, minha mãe Gilda, meus irmãos Marcos e Jefferson, pelo amor, dedicação e apoio imensurável, agradeço principalmente pelos valores e princípios a mim repassados.

A todos os funcionários, estagiários, colegas e professores da pós graduação, em especial aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular Fernanda, Mayara, Isabela, Marcelo, Janaína, Letícia, Stéfano, Tammy, Hérica, Vanessa, obrigada á todos pelas inúmeras vezes que dividiram comigo seus conhecimentos e amizade.

Ao Prof.^o Dr.^o Luciano Nakazato e Prof.^a Dr.^a Valéria Dutra, agradeço imensamente pela oportunidade, ensinamentos e por toda orientação.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

RESUMO

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E NA EXPRESSÃO DO OLIGOPEPTÍDEO PERMEASE DE ISOLADOS DE *Pasteurella multocida* PULMÕES SUÍNOS

A *Pasteurella multocida* é um importante patógeno envolvida em infecções respiratórias, como rinite atrófica e pneumonias suínas, sendo as baixas temperaturas e o biofilme fatores importantes para o aumento e cronicidade destas infecções, acarretando em grandes perdas econômicas. O sistema de transporte ABC oligopeptídeo permease (*opp*) é um fator de virulência nutricional importante para a captação de peptídeos, que é induzido em baixas temperaturas, no entanto em *P. multocida* não há estudos relacionado a este sistema de transporte. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da baixa temperatura na formação de biofilme e na expressão do *opp* em *P. multocida* isoladas de lesões pneumônicas de suínos. Sete isolados de *P. multocida* foram selecionados para a indução de formação de biofilme em placas, nas condições de 25°C e 37°C, durante 24 e 48 horas. O isolado *Pm* 16759, obteve maior formação de biofilme na condição de 25°C durante 24 horas, e aproximadamente o dobro de produção de biofilme na condição de 37°C durante 48 horas de incubação. Os níveis de transcritos dos genes *oppA1* e *oppA4* foram super expressos quando submetidos a baixa temperatura (25°C) durante 24 horas. Em 48 horas, o gene *oppA1* foi reprimido e o *oppA4* foi três vezes super expressos a 37°C. No entanto, os genes *oppB*, *oppD* e *oppF* apresentaram níveis de transcrição similar a referência de 37°C, porém reprimido à 25°C. Concluiu-se que a temperatura influenciou a formação de biofilme e os genes *oppA1* e *oppA4*, super expressos neste estudo, foram regulados pelo tempo de 24 horas e pela temperatura de 25°C, sugerindo a formação de biofilme em baixas temperaturas.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, temperatura, biofilme, qRT-PCR, *opp*.

ABSTRACT

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON BIOFILME FORMATION AND EXPRESSION OF OLIGOPEPTIDE PERMEASE OF ISOLATES OF *Pasteurella multocida* SWINE LUNGS

Pasteurella multocida is an important pathogen involving respiratory infections, such as atrophic rhinitis and swine pneumonia, with low temperatures and biofilm being important factors for the increase and chronicity of these infections, leading to great economic losses. The ABC transport system *oligopeptide permease (opp)* is an important nutritional virulence factor for the uptake of peptides, however in *P. multocida* there is no study related to this transport system. The objective of this study was to evaluate the influence of the low temperature on biofilm formation and the expression of *opp* in *P. multocida* isolated from pneumonic lesions of swine. Seven isolates of *P. multocida* were selected for the induction of biofilm formation in plates at 37 ° C and 25 ° C for 24 and 48 hours. The isolate Pm 16759 obtained higher biofilm formation at the 25 ° C condition for 24 hours, and approximately twice the biofilm production at the 37 ° C condition for 48 hours incubation. The transcript levels of *oppA1* and *oppA4* were overexpressed when subjected to low temperature (25°C) for 24 hours. Within 48 hours, *oppA1* was repressed and *oppA4* was three times more super expressed at 37°C. However, *oppB*, *oppD* and *oppF* showed levels of transcription similar to the reference of 37 ° C, but with repression at 25 °C. It is concluded that the temperature influences the formation of biofilm and the *oppA1* and *oppA4* genes overexpressed in this study, are regulated by the time of 24 hours and by the temperature of 25 °C, and may be associated with biofilm formation at low temperatures.

Key words: *Pasteurella multocida*, temperature, biofilm, qRT-PCR, *opp*.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 – Expressão relativa dos genes <i>oppA1</i> , <i>oppA4</i> , <i>oppB</i> , <i>oppD</i> , <i>oppF</i> e <i>oppC</i> de <i>P. multocida</i> (<i>Pm</i> 16759) submetidos a qRT-PCR nas condições de tratamentos 37°C e 25°C durante 24 horas, 37°C e 25°C durante 48 horas.....	43
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR e gene de controle endógeno.....41

Tabela 2: Resultados dos níveis da leitura da OD600 na formação de biofilme em isolados de *P. multocida* entre as condições de cultivos 37°C e 25°C durante 24 horas e 37°C e 25°C durante 48 horas..... 42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	122
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	133
2.1 Características etiológicas	Erro! Indicador não definido. 3
2.2 Patogenia e sinais clínicos	Erro! Indicador não definido. 4
2.3 Fatores de virulência	Erro! Indicador não definido. 5
2.3.1 Biofilme	Erro! Indicador não definido. 5
2.3.2 <i>Sistema de transporte oligopeptideo permease</i>	Erro! Indicador não definido. 16
2.4 Diagnóstico	Erro! Indicador não definido. 7
2.5 Controle e Tratamento	Erro! Indicador não definido. 7
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Cultivo	Erro! Indicador não definido. 18
3.2. Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	19
3.3. <i>Transcriptase reverse quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)</i>	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO.....	2931

1 INTRODUÇÃO

A *Pasteurella multocida* é um importante patógeno envolvido nas infecções respiratórias, como rinite atrófica e pneumonia suínas (LIU et al., 2017). A etiologia destas infecções respiratórias não está bem esclarecida, pois a *P. multocida* pode ser um agente primário ou secundário a outras bactérias nestas infecções (OLIVEIRA FILHO et al., 2015).

As mudanças de temperatura predis põem diretamente ao aumento de casos de infecções respiratórias em suínos, gerando visíveis perdas econômicas para suinocultura (GAO et al., 2016; YU et al., 2015). Um dos mecanismos da influência da baixa temperatura é redução da resposta imune do hospedeiro, já descrito, em *Moraxella catarrhalis* a expressão de genes associados à adesão e produção de biofilme (PEARSON et al., 2006).

O biofilme é um importante fator de sobrevivência e proteção para os microrganismos em ambientes hostis, como as que ocorrem por variações de pH e de temperatura (NAVES et al., 2008). As infecções causadas por microrganismos formadores de biofilmes frequentemente são difíceis de tratar, levando a cronicidade das infecções (COSTERTON et al., 1999).

Vários fatores de virulência em *P. multocida* têm sido descritos. No entanto não há estudos relacionados ao sistema de transporte ABC *oligopeptideo permease* (YU et al., 2014).

O sistema de transporte *opp* caracteriza-se por ser um fator de virulência nutricional composto pelos genes *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF* (YU et al., 2014).

O *opp* é responsável pela regulação de importantes processos celulares, alterando fatores associados à virulência, como adesão à célula hospedeira e formação de biofilme, influenciando assim a sobrevivência e patogenicidade bacteriana (YU et al., 2014).

Tendo em vista que a temperatura do sistema respiratório superior altera de acordo com as mudanças de temperatura do ambiente, afetando a expressão gênica em bactérias patogênicas (ROUADI et al., 1999; BOREZEE et al., 2000), o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a influência da baixa temperatura sobre a formação de biofilme e na expressão dos genes *opp* em amostras de *P. multocida* isoladas pulmões de suínos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil durante o 4º trimestre de 2016 foi responsável pela produção de 938,16 mil toneladas de carne suína, e o estado de Mato Grosso pelo abate de mais de 80,33 mil suínos (IBGE, 2017).

As doenças respiratórias chamadas de Complexo Respiratório dos Suínos (CRDS) geram grandes perdas econômicas na suinocultura, tendo sua etiologia composta por uma variedade de eventos infecciosos, ambientais, de manejo e genético (OPRIESSNIG et al., 2011; SORENSEN et al., 2006).

Muitos microorganismos estão envolvidos no CRDS, entre eles os agentes bacterianos primários nas pneumonias *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) (FRAILE et al., 2010; FABLET et al., 2012), sendo agravada por outros agentes como *Streptococcus suis* (*S. suis*), *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) (PIJOAN, 2006; HANSEN, et al., 2010; FABLET et al., 2012), Vírus da Influenza Suína (SIV), Vírus Reprodutivo e Respiratório dos Suínos (PRRSV), Circovírus tipo 2 (PCV-2) e Coronavírus Respiratório (PRCV) (SORENSEN, et al., 2006).

A *P. multocida* é um patógeno comumente isolado de lesões de pneumonias de suínos (FALK et al., 1991, CHOI et al., 2003), atua como agente secundário em broncopneumonias, e está associada a pleurites, pericardites, septicemias e pneumonias necrohemorrágicas (PORS et al., 2011, PIJOAN e FLUENTES, 1987; ONO et al., 2003; CAPPUCCIO et al., 2004). A *P. multocida* apesar de ser considerado um agente secundário em pneumonia enzoótica, há estudos que mostram-a como agente primário (HANSEN et al., 2010; OLIVEIRA FILHO et al., 2015).

2.1 Característica etiológica

A *P. multocida* é um cocobacilo gram negativo, anaeróbio facultativo, imóvel, incapaz de desdobrar uréia e positivo nos testes de oxidase, indol e catalase, pertence à família *Pasteurellaceae* sendo a *Pasteurella*, o *Actinobacillus*, e o *Haemophilus* os principais gêneros componentes (PIJOAN, 2006).

É um microrganismo que cresce em ágar sangue ovino 5%, porém não tem um bom crescimento em ágar MacConkey e não requer o fator X e V para o seu crescimento (PIJOAN, 2006). As colônias geralmente apresentam coloração acinzentada e brilhante, não hemolíticas e características morfológicas lisas ou mucoides, medindo diâmetro de 0,5 a 2.0 µm após 24 horas de incubação e superiores a 3.0 µm em períodos de maiores incubação (BIBERSTEIN e HIRSH, 2003).

Classificada também de acordo com a cápsula de polissacarídeo, com antígenos somáticos e sorotipos capsulares (A, B, D, E e F) sendo os sorotipos A, B, D e F detectados em suínos (PIJOAN, 2006). O sorotipo B é considerado o sorotipo mais patogênico, no entanto é de ocorrência rara com registros apenas no Sudeste da Ásia, China e Índia (PIJOAN, 2006). Dentre os sorotipos somáticos, os sorotipos A e D são amplamente disseminados entre os suínos (BOROWSKI et al., 2007).

O sorotipo A é o mais frequente associado à pneumonia (PIJOAN, 2006), embora, existam trabalhos que demonstrem o aumento no número de isolados do sorotipo D (JORDAN et al., 2006; MORES, 2006; PIJOAN, 2006; BOROWSKI, et al., 2007).

O sorotipo D era comumente identificado e associado à rinite atrófica progressiva. Um fator importante que desencadeia essa doença é a infecção concomitante por *Bordetella bronchiseptica* (BOROWSKI et al., 2007). Na classificação baseada em antígenos somáticos foi identificados 16 sorotipos somáticos, dos quais os sorotipos 3 e 5 são os mais detectados em suínos (PIJOAN, 2006; BOROWSKI et al., 2007). As cepas A:3, A:5, D:5 e D:3 são as mais prevalentes, respectivamente (PIJON, 2006).

2.2 Patogenia e sinais clínicos

A *P. multocida* é comensal à mucosa e ao trato respiratório superior dos animais (QUINN et al., 2002), sendo isolada da cavidade nasal e das tonsilas dos

suínos sadios (PIJOAN, 2006). Entretanto pode causar a pasteurelose pulmonar nos suínos, sua patogenia ainda não é completamente esclarecida (PIJOAN, 2006).

Os sinais clínicos variam dependendo da patogenicidade da cepa de *P. multocida* e da imunidade do animal infectado, o qual normalmente apresenta dispneia, respiração abdominal, hipertermia, tosse e prostração (PIJOAN, 2006; BOROWSKI et al., 2007)

As lesões de *P. multocida* ocorrem principalmente na cavidade torácica e são sobrepostas às lesões causadas por *M. Hyopneumoniae* quando o animal tem infecção concomitante por esses dois agentes. Ocorre pleurite e abscessos, com aderência da pleura à parede torácica. A pleurite geralmente apresenta característica não exsudativa, auxiliando na diferenciação da pleurite causada por *A. pleuropneumoniae* (BOROWSKI et al., 2007; OLIVEIRA FILHO et al., 2015).

2.3 Fatores de virulência

Os componentes estruturais das bactérias apresentam diferentes funções desempenhando papel importante na patogênese, atuando como fatores de virulência. Vários componentes microbianos intracelulares e extracelulares atuam exclusivamente como fatores de virulência (MADIGAN et al., 2010).

Os genes que codificam estes fatores subdividem-se em: genes de virulência verdadeiro, responsáveis pelos danos celulares provocados; Genes associados a virulência, que regulam ou ativam a expressão da classe anterior; E genes relacionados a patogênese do microrganismo, que auxiliam na colonização, invasão e sobrevivência durante o processo infeccioso (WASSENAAR et al., 2001).

Em *P. multocida* diversos fatores de virulência têm sido estudados, como a presença de cápsula, o lipopolissacarídeo (LPS), proteínas da membrana externa tóxicas (tox A); adesinas, leucotoxinas, enzimas que possam estar envolvidas na produção de doenças como a hialuronidase e neuraminidase, aquisição de ferro e a formação biofilme (BOYCE et al., 2002; SILVA et al., 2016; MORAES et al., 2014; BIBERSTEIN e HIRSH, 2003).

2.3.1 Biofilme

O biofilme microbiano caracteriza-se por uma comunidade de bactérias, altamente dinâmica que atua de maneira coordenada, adere-se às superfícies bióticas e/ou abióticas (sésseis) ou suspensas em solução (planctônicas), cujas células podem ou não estar envolvidas por uma matriz de exopolímeros (polissacarídeos, proteínas, lipídeos), podendo ser formado a partir de uma ou de múltiplas espécies (SCHNEIDER, 2007).

A adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme são causas comuns de infecções persistentes (COSTERTON et al., 1999).

Uma das mais importantes características dos biofilmes bacterianos é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos. Bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica (DAVIES et al., 2003), indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de bactérias planctônicas aos mesmos agentes (STEWART et al., 2002).

2.3.2 Sistema de transporte oligopeptídeo permease (*opp*)

O sistema de transporte de oligopeptídeos (Opp) é um transportador do tipo ABC (ATP-Binding Cassette) de captação e aquisição de nutrientes, auxiliando as bactérias em respostas às mudanças em seu ambiente, mediando funções como *quorum sensing*, esporulação e transporte de ferormônios (WANG et al., 2004). Porém sua principal função é o transporte de peptídeos realizado pelas proteínas associadas à membrana citoplasmática (HILLES e HIGGINS, 1986; NEPOMUCENO et al., 2007).

Estes sistemas têm sido identificados em diversas bactérias gram-negativas e gram-positivas. O sistema *Opp* foi identificado, sendo codificado por 5 genes *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*, organizado na forma de um operon policistrônico (HILLES e HIGGINS, 1986). Assim sendo, a capacidade de captar peptídeos torna-se, portanto, uma propriedade essencial para a sobrevivência das bactérias em diferentes ambientes (PAYNE e GILVARG, 1968; HILLES e HIGGINS, 1986).

O sistema *Opp*, geralmente compreende cinco componentes. As proteínas transmembranas integrais *OppB* e *OppC* (domínios transmembranas ou domínios integrais de membrana), são responsáveis pela formação de um canal através da membrana citoplasmática, utilizado para o transporte de peptídeos. As duas proteínas de membrana citoplasmáticas *OppD* e *OppF* (domínios de ligação nucleotídica ou domínios de ligação ao ATP), fornecem energia necessária para o transporte dos peptídeos. Por fim, a proteína *OppA* (*SBP – Substrate Binding Protein*), é uma proteína de ligação ao substrato, responsável pela captação de peptídeos do meio externo, e em seguida, transportá-lo ao poro formado pelo domínio transmembrana (*OppB* e *OppC*). Em bactérias gram-negativas, esta proteína encontra-se no espaço periplasmático, enquanto que em bactérias gram-positivas é uma lipoproteína. Esta proteína liga o substrato peptídico e facilita esta captação interagindo e entregando o peptídeo ao complexo *OppBCDF* (HILLES e HIGGINS, 1986; MONNET, 2003).

Este sistema de transporte desempenha um papel importante na adesão e formação do biofilme em *Vibrio alginolyticus*, e *M. catarrhalis*, sendo esses fatores influenciado pelo choque frio em *M. catarrhalis* (LIU et al., 2017; JONES e MURPHY 2015).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da pasteurelose é baseado nos sinais clínicos, nas lesões macroscópicas e do isolamento do agente associando às alterações patológicas ou da realização de outros testes de diagnóstico como a detecção por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BOROWSKI et al., 2007; PIJOAN, 2006; SUN et al., 2010).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outros agentes que causam lesões semelhantes (CAPPUCCIO et al., 2004) como por *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *B. bronchiseptica*, *S. suis*, *SIV*, *Arcanobacterium pyogenes*, *H. parasuis* e *Mycoplasma hyorhinis* (BOROWSKI, et al., 2007).

2.5 Controle e Tratamento

Medidas profiláticas como correções ambientais, melhorias nas práticas de manejo, antibiótico terapia e vacinação são ações utilizadas para o controle das pasteurellose respiratórias suínas (PIJOAN, 2006). Os antimicrobianos comumente administrados são tetracilinas, ceftiofur, amoxicilina, florfenicol, lincomicina, lilmicosina e sulfa-trimetropima (BOROWSKI et al., 2007). A eficácia destes agentes antimicrobianos pode variar, dependendo da susceptibilidade do isolado, A *P. multocida* exibe resistência a vários antimicrobianos, devem ser realizados antibiogramas antes de instituir o tratamento (PIJOAN, 2006; FURIAN et al., 2016).

A *P. multocida* é um importante agente nas infecções, porém ainda não há estudos relacionados sobre a influência da temperatura na formação de biofilme e na expressão do sistema de transporte *oligopeptídeo permease*, dessa forma é importante compreender os mecanismos de patogênese para orientar o desenvolvimento de tratamento e prevenção, tendo em vista que este sistema de transporte é um forte candidato a vacina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo

Foram selecionados 06 isolados de *P. multocida*, identificados e classificados de suínos com pneumonia no laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso *campus* Cuiabá e o isolado *Pm* 16759, sorotipo A, identificado previamente por Oliveira Filho et al. (2015).

O pré-inoculo foi cultivado em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI-Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, 1µL do pré-inoculo foi diluído (1:100) em meio BHI e foi transferido para placas de poliestireno de 96 poços (Sigma-Aldrich Nunc-Immno). Como controle negativo foi utilizado apenas o meio BHI. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e incubada na temperatura de 37°C e 25°C durante 24 e 48 horas.

A quantificação do biofilme foi realizada com corante cristal violeta 1% (Naves et al., 2008) obtida leitura da Densidade Optica 600nm, através de

espectrofotômetro BioTek[®]. Para as diferenças dos níveis da leitura, foi aplicado o teste de *t-Student* admitindo-se como níveis de significância valores de $p < 0,05$.

3.2 Extração RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído das bactérias sésseis do isolado patogênico *Pm* 16759 seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2004), tratado com a enzima DNase I (Fermentas[™]) e posteriormente realizado a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando 5µL de RNA, a enzima *transcriptase reversa Superscript II* e primer “*Random hexamer*” (Invitrogen).

3.3 Transcriptase reverse quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Os oligonucleotídeos utilizados na técnica de qRT-PCR (Tabela 01), foram obtidos a partir do genoma completo da *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* (*Pm* 16759), utilizando os programas *Primer 3 plus* (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), e *Integred DNA Technologies (IDT)* (<https://www.idtdna.com/site>), e as seqüências comparadas com o GenBank (*National Center for Biotechnology Information*) para confirmação de sua especificidade.

As reações foram realizadas em triplicata contendo, um supermix (SYBR Green qPCR mix *Applied Biosystems, Foster City, CA*), 4 picomol (pmol) de cada oligonucleotídeo, 20 nanogramas (ng) de cDNA, em um volume final de 20 µL.

A *transaldolase* foi utilizada como gene de controle endógeno e água ultra pura como controle negativo. As reações foram realizadas no sistema *StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems)*, nas condições de desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 60° C por 60 segundos. Os níveis de expressão relativa dos transcritos foram calculados utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (BOOKOUT et al., 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de biofilme não apresentou diferença entre os isolados de *P. multocida* nas condições de indução de formação de biofilme em placa, com exceção do isolado *Pm* 16759, onde na condição de baixa temperatura (25°C) e durante o tempo de incubação de 24 horas atingiu formação de biofilme (Tabela 2). De forma similar, durante o período de 48 horas de indução de biofilme, este mesmo isolado produziu mais que o dobro de biofilme, entretanto em temperatura mais elevada (37°C) (Tabela 2).

Considerando os níveis de transcritos à 37°C durante 24 horas como referência, os transcritos de *oppA1* e *oppA4* foram aproximadamente 30 e 28 vezes mais expressos, respectivamente à condição de 25°C, no entanto o *oppB*, *oppD* e *oppF*, foram reprimidos pela condição de baixa temperatura (Figura 1), corroborando ao estudo realizado em *M. Catarrhalis* e *Listeria Monocitogenes*, onde a baixa temperatura aumentou consideravelmente os níveis de transcrição do *oppA*, sugerindo que este gene é influenciado por um promotor diferente dos demais oligopeptídeos deste sistema de transporte (JONES e MURPHY, 2015; BOREZEE et al., 2000).

Em 48 horas, *oppA1* foi reprimido independente da temperatura, e o *oppA4* foi três vezes mais expresso à 37°C, mostrando que a transcrição destes genes ocorre nas primeiras horas do choque térmico (JONES e MURPHY, 2015; BOREZEE et al., 2000). Os genes *oppB*, *oppD* e *oppF* apresentaram níveis de transcrição similar ao de referência 37°C, porém houve repressão deste genes a 25°C (Figura 1).

Durante o tempo de 48 horas, foi observado que os níveis de transcrição do *opp* são reprimidos, conforme relatado em *M. catarrhalis* e *Vibrio alginolyticus*, os níveis de transcrição diminuíram conforme o prolongamento do tempo de incubação (JONES e MURPHY, 2015; LIU et al., 2017).

O gene *oppC* obteve níveis de transcrição apenas na condição de referência 37°C, nas demais condições este gene foi reprimido tanto na baixa temperatura de 25°C, como pelo tempo de incubação de 24 e 48 horas, sugerindo que a transcrição deste gene não seja influenciada pela baixa temperatura e pelo tempo de incubação.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a temperatura influenciou a formação de biofilme no isolado de *P. multocida* de maior patogenicidade deste estudo.

Os genes *oppA1* e *oppA4* superexpressos foram regulados pelo tempo de 24 horas e pela temperatura de 25°C e podem estar associados a formação de biofilme em baixas temperaturas.

REFERÊNCIAS

BIBERSTEIN, E.L., HIRSH, D.C. Pasteurell. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Mircrobiologia Veterinária**. Rio de Janeiro; Editora Guanabara Koogan S.A., p.127-135, 2003.

BOOKOUT, A. L. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr Protoc Mol Biol**, v.15, p. 15.8, 2006.

BOREZEE, E. et al. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. **Infect Immun**, v.68, n. 12, p. 7069–7077, 2000.

BOROWSKI, S.M. et al. Pasteurelose pulmonar. In: **Doenças dos Suínos** (Ed) Jurij Sobestiansky, David Barcellos. – Goiânia: Cãnone Editorial, v. 1, p.177-181, 2007.

BOYCE, J.D. et al. Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. **Infect Immun**. 2002.

CAPPUCCIO, J. et al. Phenotypic Characterization of *Pasteurella multocida* Straits isolated from pigs with bronco and pleuropneumonia. In.: **International Pig Veterinary Socciety Congress**. Hamburg/Germany. Proceedings... v.1, p. 205. 2004.

CHOIN-KIM, K. et al. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiol**. v. 28, p. 75-92, 1991.

CONSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v.11, p. 217-221, 1999.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DAVIES, D.G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science.** v. 280, p. 295-298, 1998.

FABLET, C. et al. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. **Veterinary Microbiology.** v. 157, p.152-163, 2012.

FALK, K. et al. Na abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic Pneumonia of Pigs: Microbiological Findings and Their Relationship to Pathomorphology. **Acta Vet Scand.** v.32, n.1, p. 67-77, 1991.

FRAILE, L. et al. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. **The Veterinary Journal.** v. 184, p. 326-333, 2010.

FURIAN, F.Q. et al. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. **Braz J Microbiol.** v. 47, n.1, p. 210–216, 2016.

GAO, X. et al. Impact of meteorological factors on the prevalence of porcine pasteurellosis in the southcentral of Mainland China. **Prev Vet Med.** v. 125, p.75-81. 2016.

GARMORY, H. S.; TITBALL, R.W. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. **Infect Immun**, v.72, p. 6757–6763. 2004.

HANSEN, M.S. et al. An investigation of the Pathology and Pathogens 35 associated with Porcine Respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology.** v. 143, p. 120-131, 2010.

HILLES I.D.; HIGGINS C.F. Peptide uptake by *Salmonella typhimurium* the periplasmic oligopeptide-binding protein. **Eur. J. Biochem.** v.158, p.561-567, 1986.
HIRON, A. et al. Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v.189, n.14, p. 5119-29, 2007.

IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Março de 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201604caderno.pdf>. Acesso em: 23 de julho de 2017.

JONES M. M. et al. Role of the Oligopeptide Permease ABC Transporter of *Moraxella catarrhalis* in Nutrient Acquisition and Persistence in the Respiratory Tract. **Infect Immun.** v.82, n.11, p.4758–4766, 2014.

JONES M.M.; MURPHYA T. F. Expression of the Oligopeptide Permease Operon of *Moraxella catarrhalis* Is Regulated by Temperature and Nutrient Availability. **Infection and Immunity.** v.83, p.3498-3505, 2015.

JORDAN, D., et al. *Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex (PRDC). **American Association of Swine Veterinans.** v. 37, p.149-152, 2006.

KICH, J.D., MORES, N., TRIQUES, N.J., NOGUEIRA, M.G., LOCATELLI, C., KLEIN, C.S., FELÍCIO, R.P. A *Pasteurella multocida* Tipo A atua como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves.** 7p. (Comunicado Técnico, 469), 2007.

LIU, H. et al. Occurrence of *Pasteurella multocida* among pigs with respiratory disease in China between 2011 and 2015. **Ir Vet J.** v.70, n. 2, p. 2-6, 2017.

LIU, W. et al. Contributions of the oligopeptide permeases in multistep of *Vibrio alginolyticus* pathogenesis. **Microbiologyopen.** v. 511, p.1-9, 2017.

MADIGAN, M.T. et al. Princípios de genética bacteriana. **Microbiologia de Brock.** v. 12, Porto Alegre. Artmed. P. 278-309, 2010.

MONNET, V. Bacterial oligopeptide-binding proteins. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** v.60, p.2100-2014, 2003.

MORAES, dS.D. D. F. et al. Ocorrência de genes *tad* associados à formação de biofilme em isolados de *Pasteurella multocida* de pulmões de suínos com pneumonia. **Pesq. Vet. Bras.** v.34, p.1147-1152, 2014.

NAVES, P. et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**. v.45, n.2, p. 86-91. 2008.

NEPOMUCENO, R.S.L. et al. The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence, and characterization. **Oral Microbiology Immunology**. v. 22, p. 1-8, 2007.

OLIVEIRA FILHO, J. X. et al. *Pasteurella multocida* type A as the primary agent of pneumonia and septicemia in pigs. Pesq. **Vet. Brasileira (Impresso)**, v.35, p.716-724, 2015.

OPRIESSNIG, T. et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 634-640, 2004.

PAYNE JW.; GILVARG C. Size restriction on peptide utilization in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.243, p.6291-6299, 1968.

PEARSON, M. M. Biofilm Formation by *Moraxella catarrhalis* In Vitro: Roles of the UspA1 Adhesin and the Hag Hemagglutinin. **Infect Immun**, v.74, n. 3, p.1588–1596, 2006.

PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurelosis. In: STRAW, B. E. et al **Disease of Swine**. 9a ed. Iowa; Iowa State University Press, p.719-726, 2006.

PIJON, C.; FLUENTES, M. Severe pleuritis associated with certain strains of *Pasteurella multocida* in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.191, p. 823-826, 1987.

PORS, S.E. et al. Genetic diversity and associated pathology of *Pasteurella multocida* isolated from porcine pneumonia. **Veterinary Microbiology**. v. 150, p. 354-361, 2011.

QUINN, P.J. et al. *Pasteurella* species and *Mannheimia haemolytica*. In: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Oxford: Blackwell Science Ltd. p.137-143, 2002.

ROUADI, P. et al. A technique to measure the ability of the human nose to warm and humidify air. **Journal of Applied Physiology**. v. 87, n. 1, p. 400-406, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press,2001. 253p.

SCHNEIDER, R.P. Biofilmes microbianos, Microbiologia em foco. V1, n.2, p. 4-12, 2007.

SILVA M. I. V. et al. Identificação de transcritos diferencialmente expressos por *Pasteurella multocida* em condições de privação de ferro. **Pesq. Vet. Bras**. v.36, n.10, p. 969-970, 2016.

SORENSEN, V. et al. Diseases of the Respiratory System. In: **Disease of Swine**, Straw, B. E. et al. – 9a ed. Iowa; Iowa State University Press. p. 149-177, 2006.

STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 292, p. 107-113, 2002.

SUN, D. et al. Development of a novel LAMP diagnostic method for visible detection of swine *Pasteurella multocida*. **Veterinary Research Communications**. v. 34, p. 649-657, 2010.

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **Fems Microbiology Letters**. v. 201, p. 1-7, 2001.

YU, D. et al. Diversity and evolution of oligopeptide permease systems in staphylococcal species. **Genomics**. v.104, n.1, p.8-13, 2014.

YU, L. et al. Association between Temperature Change and Outpatient Visits for Respiratory Tract Infections among Children in Guangzhou, China. **Int J Environ Res Public Health**. v.12, n.1, p. 439–454, 2015.

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to
Ciência Rural

Manuscript ID
CR-2017-0540

Title
Influência da temperatura sobre a formação de biofilme e na expressão do oligopeptídeo permease de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas de suínos

Authors
Kagueyama, Francielle

Date Submitted
03-Aug-2017

Influência da temperatura sobre a formação de biofilme e na expressão do oligopeptídeo permease de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas de suínos

Influence of temperature on biofilm formation and on the expression oligopeptide permease from *Pasteurella multocida* samples isolated from pneumonic pig lesions

Francielle Cristina Kagueyama^I Mayara I.V. Silva^I Paula Gabriela Cesarino^I João

Xavier de Oliveira Filho^{II} Nelson Morés^{II} Valéria Dutra^I Luciano Nakazato^I

- NOTA -

RESUMO

A *Pasteurella multocida* é um importante patógeno envolvida em infecções respiratórias, como rinite atrófica e pneumonias suínas, sendo as baixas temperaturas e o biofilme fatores importantes para o aumento e cronicidade destas infecções, acarretando em grandes perdas econômicas. O sistema de transporte ABC oligopeptídeo permease (*opp*) é um fator de virulência nutricional importante para a captação de peptídeos, que é induzido em baixas temperaturas, no entanto em *P. multocida* não há estudos relacionado a este sistema de transporte. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da baixa temperatura na formação de biofilme e na expressão do *opp* em *P. multocida* isoladas de lesões pneumônicas de suínos. Sete isolados de *P. multocida* foram selecionados para a indução de formação de biofilme em placas, nas condições de 25°C e 37°C, durante 24 e 48 horas. O isolado *Pm* 16759, obteve maior formação de biofilme na condição de 25°C durante 24 horas, e aproximadamente o dobro de produção de biofilme na condição de 37°C durante 48 horas de incubação. Os níveis

^ILaboratório de Microbiologia Veterinária e Biologia Molecular Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa s/n, Coxipó, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil. Autor para correspondência: lucnaka@gmail.com.

^{II}Embrapa Suínos e Aves, Rodovia BR153 Km 110, Distrito de Tamanduá, Cx. Postal 21, Concórdia, SC 89700-000, Brasil.

de transcritos dos genes *oppA1* e *oppA4* foram super expressos quando submetidos a baixa temperatura (25°C) durante 24 horas. Em 48 horas, o gene *oppA1* foi reprimido e o *oppA4* foi três vezes super expressos a 37°C. No entanto, os genes *oppB*, *oppD* e *oppF* apresentaram níveis de transcrição similar a referência de 37°C, porém reprimido à 25°C. Concluiu-se que a temperatura influenciou a formação de biofilme e os genes *oppA1* e *oppA4*, super expressos neste estudo, foram regulados pelo tempo de 24 horas e pela temperatura de 25°C, sugerindo a formação de biofilme em baixas temperaturas.

Palavras-chave: *Pasteurella multocida*, temperatura, biofilme, qRT-PCR, *opp*.

ABSTRACT

Pasteurella multocida is an important pathogen involving respiratory infections, such as atrophic rhinitis and swine pneumonia, with low temperatures and biofilm being important factors for the increase and chronicity of these infections, leading to great economic losses. The ABC transport system oligopeptide permease (*opp*) is an important nutritional virulence factor for the uptake of peptides, however in *P. multocida* there is no study related to this transport system. The objective of this study was to evaluate the influence of the low temperature on biofilm formation and the expression of *opp* in *P. multocida* isolated from pneumonic lesions of swine. Seven isolates of *P. multocida* were selected for the induction of biofilm formation in plates at 37 ° C and 25 ° C for 24 and 48 hours. The isolate *Pm* 16759 obtained higher biofilm formation at the 25 ° C condition for 24 hours, and approximately twice the biofilm production at the 37 ° C condition for 48 hours incubation. The transcript levels of *oppA1* and *oppA4* were overexpressed when subjected to low temperature (25°C) for 24 hours. Within 48 hours, *oppA1* was repressed and *oppA4* was three times more super expressed at 37 ° C. However, *oppB*, *oppD* and *oppF* showed levels of transcription similar to

the reference of 37 ° C, but with repression at 25 ° C. It is concluded that the temperature influences the formation of biofilm and the *oppA1* and *oppA4* genes overexpressed in this study, are regulated by the time of 24 hours and by the temperature of 25 ° C, and may be associated with biofilm formation at low temperatures.

Key words: *Pasteurella multocida*, temperature, biofilm, qRT-PCR, *opp*.

A *Pasteurella multocida* é importante patógeno envolvido nas infecções respiratórias, como rinite atrófica e pneumonia suínas (LIU et al., 2017). A etiologia destas infecções respiratórias ainda é complexa, onde a *P. multocida* pode ser um agente primário ou secundário a outras bactérias nestas infecções (OLIVEIRA FILHO et al., 2015; KICH et al., 2007).

As mudanças de temperatura predis põem diretamente ao aumento de casos de infecções respiratórias em crianças e, em suínos, gerando visíveis perdas econômicas para suinocultura (GAO et al., 2016; YU et al., 2015). Um dos mecanismos da influência da baixa temperatura é redução da resposta imune do hospedeiro, já descrito em *M. catarrhalis* a expressão de genes associados a adesão e produção de biofilme (PEARSON et al., 2006). O biofilme é um importante fator de sobrevivência e proteção para os microorganismos em ambientes hostis, com variações de pH e de temperatura (NAVES et al., 2008). As infecções causadas por microorganismos formadores de biofilmes frequentemente são difíceis de tratar, levando a cronicidade das infecções (COSTERTON et al., 1999).

Vários fatores de virulência em *P. multocida* tem sido descritos, no entanto não há estudos relacionados ao sistema de transporte ABC oligopeptideo permease, um fator de

virulência nutricional, composto pelos genes *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* e *oppF*, responsáveis pela regulação de importantes processos celulares, alterando fatores associados à virulência, como adesão à célula hospedeira, formação de biofilme, influenciando a sobrevivência e patogenicidade bacteriana (YU et al., 2014).

Tendo em vista que a temperatura do sistema respiratório superior altera de acordo com as mudanças de temperatura do ambiente, afetando a expressão gênica em bactérias patogênicas (ROUADI et al., 1999; BOREZEE et al., 2000), o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a influência da baixa temperatura sobre a formação de biofilme e na expressão dos *oligopeptídeos permease* em amostras de *P. multocida* isoladas de lesões pneumônicas de pulmões suínos.

Foram selecionados 06 isolados de *P. multocida*, identificados e classificados de suínos com pneumonia no laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso *campus* Cuiabá e o isolado *Pm* 16759, sorotipo A, identificado previamente por Oliveira Filho et al. (2015).

O pré-inoculo foi cultivado em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI-Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, 1 µL do pré-inoculo foi diluído (1:100) em meio BHI e foi transferido para placas de poliestireno de 96 poços (Sigma-Aldrich Nunc-Immno). Como controle negativo foi utilizado apenas o meio BHI. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e incubada na temperatura de 37°C e 25°C durante 24 e 48 horas.

A quantificação do biofilme foi realizada com corante cristal violeta 1% (Naves et al., 2008) e sua quantificação foi obtida por meio da leitura da densidade óptica (600nm), aferidas em espectrofotômetro BioTek®. Para as diferenças dos níveis da leitura, foi aplicado o teste de *t-Student* admitindo-se como níveis de significância valores de $p < 0,05$.

Para análise de qRT-PCR, o RNA foi extraído das bactérias sésseis do isolado patogênico *Pm* 16759, seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2004), tratado com a enzima DNase I (Fermentas™), para remoção do DNA ribossomal. E posteriormente realizou-se a síntese da primeira fita de cDNA, utilizando 5µl de RNA, a enzima *transcriptase reversa Superscript II* e primer “*Random hexamer*”(Invitrogen).

Os oligonucleotídeos utilizados na técnica de qRT-PCR (Tabela 01), foram obtidos a partir do genoma completo da *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* (*Pm* 16759), utilizando os programas *Primer 3 plus* (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), e *Integred DNA Technologies (IDT)* (<https://www.idtdna.com/site>), e as seqüências comparadas com o *GenBank (National Center for Biotechnology Information)* para confirmação de sua especificidade.

As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra contendo, um supermix (*SYBR Green qPCR mix Applied Biosystems, Foster City, CA*), 4 picomol (pmol) de cada oligonucleotídeo, 20 nanogramas (ng) de cDNA, em um volume final de 20 µL.

A *transaldolase* foi utilizada como gene de controle endógeno e água ultra pura como controle negativo. As reações foram realizada no sistema StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems), nas condições de desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 60° C por 60 segundos. Os níveis de expressão relativa dos transcritos foram calculados utilizando o método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ (BOOKOUT et al., 2006).

A produção de biofilme não apresentou diferença entre os isolados de *P. multocida* nas condições de indução de formação de biofilme em placa, com excessão do isolado *Pm* 16759, onde na condição de baixa temperatura (25°C) e durante o tempo de incubação de 24 horas atingiu formação de biofilme (Tabela 2). De forma similar, durante o período de 48

horas de indução de biofilme, este mesmo isolado produziu mais que o dobro de biofilme, entretanto em temperatura mais elevada (37°C) (Tabela 2).

Considerando os níveis de transcritos à 37°C durante 24 horas como referência, os transcritos dos genes *oppA1* e *oppA4* foram aproximadamente 30 e 28 vezes mais expressos, respectivamente à condição de 25°C, no entanto os genes *oppB*, *oppD* e *oppF*, foram reprimidos pela condição de baixa temperatura (Figura 1), corroborando ao estudo realizado em *M. Catarrhalis* e *Listeria monocitogenes* onde a baixa temperatura aumentou consideravelmente os níveis de transcrição do *oppA*, sugerindo que este seja influenciado por um promotor diferente dos demais oligopeptídeos deste sistema de transporte (JONES et al., 2015; BOREZEE et al., 2000).

Em 48 horas, o gene *oppA1* foi reprimido independente da temperatura, e o *oppA4* foi três vezes mais expresso à 37°C, mostrando que a transcrição destes genes ocorreu nas primeiras horas do choque térmico (JONES MURPHY et al., 2015; BOREZEE et al., 2000). Os genes *oppB*, *oppD* e *oppF* apresentaram níveis de transcrição similar ao de referência 37°C porém houve repressão deste genes a 25°C (Figura 1).

Durante o tempo de 48 horas, foi observado que os níveis de transcrição do *opp* foram reprimidos, conforme relatado em *M. catarrhalis* e *Vibrio alginolyticus*, onde os níveis de transcrição diminuíram conforme o prolongamento do tempo de incubação (JONES et al., 2015; LIU et al., 2017).

O gene *oppC* obteve níveis de transcrição apenas na condição de referência 37°C, nas demais condições este gene foi reprimido tanto na baixa temperatura de 25°C, como pelo tempo de incubação de 24 e 48 horas, sugerindo que a transcrição deste gene não é influenciada pela baixa temperatura e pelo tempo de incubação.

Concluiu-se que a temperatura influenciou a formação de biofilme no isolado de *P. multocida* de maior patogenicidade deste estudo.

Os genes *oppA1* e *oppA4* superexpressos foram regulados pelo tempo de 24 horas e pela temperatura de 25°C e podem estar associados a formação de biofilme em baixas temperaturas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

BOOKOUT, A. L. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr Protoc Mol Biol**, v.15, p. 15.8, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb1508s73/abstract>>. Acesso em: 04 Abr. 2017. doi: 10.1002/0471142727.mb1508s73.

BOREZEE, E. et al. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. **Infect Immun**, v.68, n. 12, p. 7069–7077, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97817/>>. Acesso em: 20 Mar. 2017. doi: 10.1128/IAI.68.12.7069-7077.2000.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/284/5418/1318/tab-pdf>>. Acesso em: 17 Mai. 2017. doi: 10.1126/science.284.5418.1318.

GAO, X. et al. Impact of meteorological factors on the prevalence of porcine pasteurellosis in the southcentral of Mainland China. **Prev Vet Med**, v.125, p.75-81, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587716300046?via%3Dihub>>. Acessado em: 18 Mai. 2017. doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.01.002.

GARMORY, H. S.; TITBALL, R.W. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. **Infect Immun**, v.72, p. 6757–6763.

2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC529116/>>. Acesso em: 20 Mar. 2017. doi: 10.1128/IAI.72.12.6757-6763.2004.

HIRON, A. et al. Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v.189, n.14, p. 5119-29, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951871/>>. Acesso em: 14 Abr. 2017. doi: 10.1128/JB.00274-07.

JONES, M. M.; MURPHYA, T. F. Expression of the Oligopeptide Permease Operon of *Moraxella catarrhalis* Is Regulated by Temperature and Nutrient Availability. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 9, p. 3498-3505, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4534648/>>. Acesso em: 17 Jan. 2017. doi: 10.1128/IAI.00597-15.

KICH, J. D. et al. A *Pasteurella multocida* Tipo A Atuaria Como Agente Primário nos Processos Pneumônicos dos Suínos. **Embrapa suínos e Aves**, 7 p. (Comunicado Técnico, 469), 2007. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=1063>. Acesso em: 18 Mai. 2017.

LIU, H. et al. Occurrence of *Pasteurella multocida* among pigs with respiratory disease in China between 2011 and 2015. **Ir Vet J**, v.70, n. 2, p. 2-6, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5223352/pdf/13620_2016_Article_80.pdf>. Acesso em: Abril. 05, 2017. doi: 10.1186/s13620-016-0080-7.

LIU, W. et al. Contributions of the oligopeptide permeases in multistep of *Vibrio alginolyticus* pathogenesis. **Microbiologyopen**, e. 511 p. 1-9, 2017. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.511/full>>. Acesso em: 29 Jul. 2017. doi: 10.1002 / mbo3.511

NAVES, P. et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, v.45, n.2 p. 86-91. 2008. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882-4010\(08\)00036-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882-4010(08)00036-3)>. Acesso em: 20 Mar. 2017. doi:10.1016/j.micpath.2008.03.003.

OLIVEIRA FILHO, J. X. et al. *Pasteurella multocida* type A as the primary agent of pneumonia and septicemia in pigs. **Pesq. Vet. Brasileira (Impresso)**, v.35, p.716-724, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v35n8/1678-5150-pvb-35-08-00716.pdf>>. Acesso em: 30 Jan. 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2015000800003.

PEARSON, M. M. Biofilm Formation by *Moraxella catarrhalis* In Vitro: Roles of the UspA1 Adhesin and the Hag Hemagglutinin. **Infect Immun**, v.74, n. 3, p.1588–1596, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1418653/>>. Acesso em: 19 Mar. 2017. doi: 10.1128/IAI.74.3.1588-1596.2006

ROUADI, P. et al. A technique to measure the ability of the human nose to warm and humidify air. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 1, p. 400-406, 1999. Disponível em: <<http://jap.physiology.org/content/87/1/400.long>>. Acesso em: 20 Mar. 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press,2001. 253p.

YU, D. et al. Diversity and evolution of oligopeptide permease systems in staphylococcal species. **Genomics**, v.104, n.1, p.8-13, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754314000639>>. Acesso em: 20 Mar. 2017. doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.04.003.

YU, L. et al. Association between Temperature Change and Outpatient Visits for Respiratory Tract Infections among Children in Guangzhou, China. **Int J Environ Res Public Health**, v.12, n.1, p. 439–454, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306872/pdf/ijerph-12-00439.pdf>>. Acesso em: 09 Mai. 2017. doi:10.3390/ijerph120100439.

Tabela 1- Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qRT-PCR e gene de controle endógeno.

Gene	Oligonucleotídeos
<i>oppA1</i>	5'CGG TGA CAA ATG GAC AGA TG3' 5'GGT AAA GCG TGG TTG GTG AT3'
<i>oppA4</i>	5'TTC TGA TTT GGC TTG GGA AC3' 5'CCA ACC GGA ACG TAT CAA TT3'
<i>oppB</i>	5'CCG TCA ATC AGC TCG TAT CA3' 5'ACA ACA AAG CTG GGA ATG AC3'
<i>oppC</i>	5'TGC TAG AAG CGG TGA CAG AA3' 5'TCG AAA TTG CAC CAA ATT CA3'
<i>oppD</i>	5'TTG CAT AAA GGC ATG GAT CA3' 5'GAG TTT CGG ACG GCA AAG TA3'
<i>Transaldolase*</i>	5'ACGGTTGTTGTCGCAGATA3' 5'GGCGTGGACAATCACTTTTT3'

Gene de controle endógeno*

Tabela 2. Resultados dos níveis da leitura da OD₆₀₀ na formação de biofilme em isolados de *P. multocida* entre as condições de cultivos 37°C e 25°C durante 24 horas e 37°C e 25°C durante 48 horas.

Amostras	37°C		25°C		P value
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
M1684/16 24H	0.09044444	0.002268953	0.08577778	0.002775555	0.0872
M1684/16 48H	0.09522222	0.01422179	0.08300000	0.01244097	0.325
M1755/16 24H	0.08666667	0.004055175	0.08511111	0.001503083	0.567
M1755/16 48H	0.08844444	0.010335125	0.07611111	0.002834967	0.117
M1896/16 24H	0.09422222	0.003421068	0.09366667	0.007172478	0.909
M1896/16 48H	0.09377778	0.014284153	0.08088889	0.003948746	0.206
M1581/16 24H	0.09511111	0.012544735	0.08900000	0.004333333	0.47
M1581/16 48H	0.09622222	0.01865575	0.07977778	0.01804111	0.334
M1750/16 24H	0.09433333	0.010203485	0.09522222	0.005872093	0.902
M1750/16 48H	0.08188889	0.002714843	0.07888889	0.004438885	0.374
M1901/16 24H	0.09266667	0.003756476	0.09388889	0.005984548	0.779
M1901/16 48H	0.11400000	0.041101500	0.08388889	0.004438885	0.276
M652/16 24h	0.08733333	0.002516611	0.09522222*	0.002545875	0.0188*
M652/16 48h	0.22511111*	0.05655119	0.09255556	0.01282503	0.0167*

Os valores que demonstram os resultados que obtiveram diferenças estatísticas*

Figura 1. Expressão relativa dos genes *oppA1*, *oppA4*, *oppB*, *oppD*, *oppF* e *oppC* de *P. multocida* (*Pm* 16759) submetidos a qRT-PCR nas condições de tratamentos 37°C e 25°C durante 24 horas, 37°C e 25°C durante 48 horas.

