

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Pasteurella* POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* EM
ISOLADOS OBTIDOS DE DIFERENTES INFECÇÕES CLÍNICAS EM GATOS
DOMÉSTICOS**

CAROLINA APARECIDA RODRIGUES

BOTUCATU, SP
Setembro, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Pasteurella* POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* EM
ISOLADOS OBTIDOS DE DIFERENTES INFECÇÕES CLÍNICAS EM GATOS
DOMÉSTICOS**

CAROLINA APARECIDA RODRIGUES

Dissertação apresentada à banca
examinadora para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária

Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária –
FMVZ/UNESP-Botucatu, SP.

Orientador: Prof. Titular Márcio
Garcia Ribeiro

BOTUCATU, SP
Setembro, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Rodrigues, Carolina Aparecida.

Identificação de espécies de *Pasteurella* por espectrometria de massas e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* em isolados obtidos de diferentes infecções clínicas em gatos domésticos / Carolina Aparecida Rodrigues. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Márcio Garcia Ribeiro
Capes: 50502034

1. Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz. 2. *Pasteurella multocida*. 3. Infecções por *Pasteurella*. 4. Farmacorresistência bacteriana.

Palavras-chave: Achados clínico-epidemiológicos; MALDI-TOF MS; *Pasteurella multocida*; Pasteurelose felina; Resistência bacteriana.

Nome da autora: Carolina Aparecida Rodrigues

Título: IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Pasteurella* POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* EM ISOLADOS OBTIDOS DE DIFERENTES INFECÇÕES CLÍNICAS EM GATOS DOMÉSTICOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Antônio Carlos Paes

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

Membro

Departamento Centro de Ciências Agrárias e Ambientais

PUC-PR - PUC, Curitiba, PR

Data da defesa: 20/09/2023

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de espécies de *Pasteurella* por espectrometria de massas em gatos domésticos com diferentes infecções clínicas. Botucatu, SP (2019-2023).

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* (método de difusão com discos) em 20 isolados de *Pasteurella* obtidos de gatos domésticos com diferentes infecções clínicas. Botucatu, SP (2019-2023).

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP Botucatu, SP.

Anexo 2. Dados epidemiológicos, achados hematológicos, identificação de espécies de *Pasteurella* e diagnóstico de FIV e FeLV em 26 gatos domésticos com pasteurelose clínica. Botucatu (2019-2023).

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Etiologia e propriedades gerais	4
2.2 Epidemiologia	5
2.3 Patogenia	6
2.4 Clínica	7
2.4.1 Abscessos	7
2.4.2 Infecções respiratórias	7
2.4.3 Infecções de orofaringe	8
2.4.4 Outras infecções	8
2.5 Diagnóstico	9
2.5.1 <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> – MALDI-TOF MS	10
2.6 Tratamento	11
2.7 Controle e profilaxia	12
2.8 Reflexos em Saúde Única	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 Geral	15
3.2 Específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Comissão de Ética	16
4.2 Animais e isolados de <i>Pasteurella</i>	16
4.3 Testagem para retrovíruses - FIV e FeLV	16
4.4 Cultivo microbiológico	17
4.5 <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> – MALDI-TOF MS	17
4.6 Perfil de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i>	1818
4.7 Análise estatística	19
5. RESULTADOS	20
5.1 Dados epidemiológicos dos gatos amostrados	20
5.2 Identificação de espécies de <i>Pasteurella</i>	21

5.3 Afecções clínicas	21
5.4 Teste de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i>	23
5.5 Hematócrito e leucometria	24
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÕES	31
8. REFERÊNCIAS	33

RODRIGUES, C.A. Identificação de espécies de *Pasteurella* por espectrometria de massas e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* em isolados obtidos de diferentes infecções clínicas em gatos domésticos. **Botucatu, 2023. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.**

RESUMO

Bactérias do gênero *Pasteurella* são micro-organismos de conhecido comportamento oportunista que habitam a microbiota da cavidade oral e do trato respiratório superior de diferentes espécies animais, particularmente dos gatos domésticos, causando grande variedade de sinais clínicos. O patógeno possui potencial zoonótico, representando uma das bactérias mais comumente isoladas de ferimentos em humanos mordidos por gatos. No entanto, descrições da pasteurelose felina têm sido praticamente restritas a relatos de casos, com estudos escassos compreendendo grande número de *Pasteurella* sp. isoladas de gatos com diferentes desordens clínicas. Ainda, a maioria dos relatos de pasteurelose felina têm baseado a identificação do patógeno restrita em nível de gênero ou o diagnóstico de espécies firmado com testes fenotípicos clássicos. Considerando esse cenário, foram investigados aspectos epidemiológicos, perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e identificação de espécies de *Pasteurella* baseada na espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) em 26 gatos domésticos com diferentes distúrbios clínicos. Do total de gatos, 65% (17/26) eram machos e 34% (9/26) fêmeas. A idade dos gatos variou entre 2 meses a 16 anos (média de 5,5 anos). A doença clínica ocorreu, predominantemente, durante a primavera (9/26=34%) e o verão (7/26=26%). Do total de animais, 53,8% (14/26) tinham acesso a rua, enquanto 30,8% (8/26) não tinham acesso a rua e 15,4% (4/26) não foi possível obter esta informação. Dentre 61% (16/26) de todos os gatos cujos dados dos desfechos estavam disponíveis, 50% (8/16) evoluíram para morte, principalmente animais com infecções sistêmicas (pneumonia e efusão pleural). Abscessos cutâneos (11/26=42%), pneumonia (3/26=11%), conjuntivite (3/26=11%) e feridas abertas (3/26=11%) foram os quadros clínicos mais comuns, além de miscelânea de distúrbios, e.g., efusão

pleural, infecções urinárias e piometra (6/26=23.1%). O diagnóstico por MALDI-TOF MS identificou predominantemente *Pasteurella multocida* (23/26=88,4%), seguida em menor frequência por *Pasteurella dagmatis* (2/26=7,7%) e *Pasteurella canis* (1/26=3,8%). Não foi observada associação significativa entre os dados epidemiológicos estudados dos gatos, diferentes infecções clínicas e a identificação das espécies de *Pasteurella* ($P>0,05$). Os isolados revelaram 100% de sensibilidade aos antimicrobianos dos grupos beta-lactâmicos (amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, ceftriaxona), tetraciclina (tetraciclina, doxiciclina) e fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, marbofloxacino, exceto um isolado resistente para norfloxacino), enquanto a maior resistência dos isolados foi observada para amicacina (10/26=38%). O diagnóstico sorológico de imunodeficiência felina (FIV) e leucemia viral felina (FeLV) revelou dois (2/26=7,7%) gatos reagentes para FeLV. Os resultados reforçam o predomínio de *P. multocida* como agente primário de diferentes infecções clínicas em gatos. A maior frequência de lesões cutâneas em gatos machos pode estar relacionada a transmissão do patógeno por mordeduras e arranhões, principalmente secundárias às disputas por território ou fêmeas em período reprodutivo. Os resultados do presente estudo contribuem com a avaliação dos principais achados clínico-epidemiológicos, identificação molecular de espécies e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de isolados de *Pasteurella* obtidos de diferentes infecções clínicas em gatos domésticos.

Palavras-chave: Pasteurelose felina, *Pasteurella multocida*, achados clínico-epidemiológicos, MALDI-TOF MS, resistência bacteriana

RODRIGUES, C.A. Mass spectrometry-based identification of *Pasteurella* species and *in vitro* antimicrobial susceptibility pattern of isolates recovered from domestic cats with different disorders. **Botucatu, 2023. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.**

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Pasteurella* are microorganisms with opportunistic behavior that inhabit the microbiota of the oral cavity and upper respiratory tract of different species of animals, particularly domestic cats, causing a wide variety of clinical signs. The pathogen has zoonotic potential, representing one of the most commonly isolated bacteria from wounds in humans bitten by cats. However, descriptions of feline pasteurellosis have been practically restricted to case reports, and a lack of studies has focused on a large number of *Pasteurella* sp. isolated from cats with different clinical disorders. Furthermore, most reports of feline pasteurellosis have been described with the pathogen identification restricted at the genus level or the species diagnosis based on classic phenotypic tests. Considering this scenario, we investigated epidemiological aspects, *in vitro* microbial sensitivity profile, and identification of *Pasteurella* species based on mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in 26 domestic cats with different clinical disorders. Of the total number of cats, 65% (17/26) were male and 34% (9/26) were female. The age of the cats ranged from 2 months to 16 years (average of 5.5 years). Clinical disorders occurred predominantly during spring (9/26=34%) and summer (7/26=26%). Among all animals, 53.8% (14/26) are breeding with free access of house, whereas 30.8% (8/26) has not access out of house, and 15.4% (4/26) this data is not available. Of 61% (16/26) of all cats for which outcome data were available, 50% (8/16) died, mostly animals with systemic infections (pneumonia and pleural effusion). Skin abscesses (11/26=42%), pneumonia (3/26=11%), conjunctivitis (3/26=11%) and open wounds (3/26=11%) were the most common clinical pictures, in addition to miscellaneous disorders, e.g., pleural effusion, urinary tract infections, and pyometra (6/26=23.1%). The

diagnosis by MALDI-TOF MS predominantly identified *Pasteurella multocida* (23/26=88.4%), followed less frequently by *Pasteurella dagmatis* (2/26=7.7%) and *Pasteurella canis* (1/26=3.8%). No significant association was observed between selected epidemiological data of domestic cat, different clinical disorders, and species identification of *Pasteurella* ($P>0.05$). The isolates showed 100% sensitivity to antimicrobials of the beta-lactam group (amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cephalixin, ceftriaxone), tetracyclines (tetracycline, doxycycline) and fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, marbofloxacin, except for one norfloxacin-resistant isolate), whereas the highest resistance of the isolates was observed for amikacin (10/26=38%). Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) revealed two (2/26=7,7%) cats reagents to FeLV. The results reinforce the predominance of *P. multocida* as a primary agent of different clinical infections in cats. The higher frequency of skin lesions in male cats may be related to the transmission of the pathogen by bites and scratches, mainly secondary to disputes over territory or females in the reproductive period. Our results contribute to the study of clinical and epidemiological features, molecular identification of species, and antimicrobial susceptibility pattern of *Pasteurella* isolated from different clinical infections in domestic cats.

Keywords: feline pasteurellosis, *Pasteurella multocida*, clinical and epidemiological data, MALDI-TOF MS, bacterial resistance

1 INTRODUÇÃO

A população de gatos domésticos tem aumentado em todo o mundo (Instituto Pet Brasil - IPB, 2022). No Brasil, o crescimento do número de gatos domiciliados tem superado os cães, com população estimada de 27 milhões de animais, detendo uma das maiores populações mundial de felinos domésticos. Em 2021, o mercado pet brasileiro movimentou R\$ 51,7 bilhões, com projeção de 14% de crescimento em 2022, alcançando faturamento de R\$ 58,9 bilhões, devido ao aumento do número de animais de companhia, principalmente nos domicílios (IPB, 2022).

Gatos domésticos, de vida livre ou ferais possuem o hábito de disputas por alimento, por fêmeas no período de reprodução, ou pela hierarquia do ambiente, principalmente entre machos adultos (LOVE, 2000). Desta forma, é comum ocorrerem lesões cutâneas secundárias a mordeduras e arranhaduras entre felinos, que podem evoluir para infecções sistêmicas (LOVE, 2000; GREENE & GOLDSTAIN, 2012).

Pasteurelas são bactérias gram-negativas de comportamento oportunista, que habitam a cavidade oral e o trato respiratório superior de animais de produção e de companhia, silvestres/selvagens, relacionadas a diferentes manifestações clínicas (WILSON & HO, 2013; PENG et al., 2019). Estima-se que mais de 50% dos gatos podem albergar espécies de pasteurela na microbiota bucal, potencialmente infectantes para outros gatos e humanos secundárias a mordeduras e arranhaduras (GREENE & GOLDSTAIN, 2012).

Os abscessos cutâneos são as lesões mais comuns observadas na pasteurelose em gatos domésticos (HARASEN & LITTLE, 2015; SYKES, 2022). Nos casos de disseminação sistêmica do patógeno, podem ser observados sinais de febre, secreção nasal, perda de peso, abscessos em órgãos, infecções oculares e do trato urinário, pneumonia, peritonite e efusões pleurais, com prognóstico reservado nas infecções sistêmicas (HARASEN & LITTLE, 2015; SYKES, 2022).

O diagnóstico de rotina da pasteurelose em gatos tem sido baseado nos achados clínico-epidemiológicos, exames subsidiários (hematológicos,

bioquímicos e de imagem), no isolamento microbiano, identificação fenotípica (bioquímica) das espécies da bactéria e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados (WILSON & HO, 2013).

Cefalosporinas, fluorquinolonas, tetraciclina e amoxicilina/ácido clavulânico são os principais grupos/antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por espécies de *Pasteurella* em gatos (GREENE & GOLDSTAIN, 2012; LLORET et al., 2013). Devido ao comportamento oportunista do patógeno e a presença da bactéria como habitante da microbiota oronasal, não existem medidas específicas recomendadas na profilaxia/controle da doença nos felinos (GREENE & GOLDSTAIN, 2012; LLORET et al., 2013).

Em humanos, *Pasteurella* sp. representa uma das bactérias mais comumente encontradas nos isolamentos microbianos a partir de amostras de ferimentos secundários a mordeduras de gatos (LLORET et al., 2013; MIRZAI et al., 2019; MU et al., 2020). Ainda, isolados de *P. multocida* obtidos de tutores e felinos do mesmo domicílio apresentaram características similares de virulência e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro*, indicando o potencial dos gatos como reservatórios do patógeno para outros animais e humanos (UJVÁRI et al., 2019). Ainda, os felinos possuem dentição de espessura fina, que facilita lesões perfurantes profundas nos tecidos, com inoculação da saliva contendo bactérias de potencial zoonótico, como espécies de *Pasteurella*, causando abscessos cutâneos e outras complicações clínicas a partir da disseminação do patógeno (LOVE, 2000), embora os riscos de mordeduras por esses animais provavelmente são subestimados, devido à aparência mínima das lesões (KHEIRAN et al., 2019).

Apesar da gravidade das infecções sistêmicas por espécies de *Pasteurella* nos felinos, as descrições da doença em gatos estão praticamente restritas a relatos de casos (DOLIESLAGER, 2011; LLORET et al., 2013; QUIMBY & LAPPIN, 2015). Ainda, na maioria das descrições em gatos, o diagnóstico de *Pasteurella* tem sido restrito ao gênero do micro-organismo ou firmado com base em testes fenotípicos clássicos (bioquímicos) (WALKER et al., 2000; FOSTER et al., 2004; FRESHWATER, 2008; WANG et al., 2009; GIORDANO et al., 2015; AWOSILE et al., 2018).

Neste cenário, o presente estudo investigou os principais achados clínico-epidemiológicos, a identificação das espécies de *Pasteurella* por espectrometria de massas e o perfil de sensibilidade microbiana *in vitro*, em isolados obtidos de diferentes infecções clínicas em gatos domésticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e propriedades gerais

O gênero *Pasteurella* pertence à família *Pasteurellaceae*, que compreende bactérias anaeróbicas facultativas que, em sua maioria, são habitantes de mucosas e do trato respiratório superior de animais domésticos, com reduzida sobrevivência no meio ambiente (GYLES et al., 2010; QUINN et al., 2011).

Pasteurella foi isolada pela primeira vez na década de 1880, cujo nome do gênero foi nomeado em homenagem ao pesquisador Louis Pasteur, que descreveu pioneiramente a bactéria como agente causal de cólera em aves (MUTTERS et al., 1985; GYLES et al., 2010).

Pasteurelas são bactérias gram-negativas com formato pleomórfico (cocos ou cocobacilar), bipolares na coloração de Gram. São imóveis, com tamanho variando entre 0,2-1 x 1-2µm. São oxidase e catalase positivas e podem fermentar glicose e outros açúcares (HAGAN et al., 1988; GYLES et al., 2010; QUINN et al., 2011; SALERNO & PAES, 2016).

O isolamento das pasteurelas pode ser obtido utilizando meios convencionais (ágar sangue bovino ou ovino a 5%) ou soro fetal bovino, incubados em condições de aerobiose, a 37°C (HAGAN et al., 1988; QUINN et al., 2011). Entre 24 e 48 horas de cultivo, as colônias possuem cerca de 1mm de diâmetro, com formato arredondado, mucóides (capsuladas), de coloração acinzentada e não formam halo hemolítico (QUINN et al., 2011).

Certos isolados patogênicos são mucóides devido à presença de cápsula de ácido hialurônico (HAGAN et al., 1988; QUINN et al., 2011). A maioria dos isolados são catalase, oxidase, indol e ornitina descarboxilase positivos e também fermentam sacarose, glicose e maltose (QUINN et al., 2011). As espécies de *Pasteurella* não são isoladas no meio de MacConkey (WILSON & HO, 2013).

Mais de 15 espécies de *Pasteurella* são conhecidas, embora *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *P. dagmatis* e *P. stomatis* sejam mais frequentemente

isoladas de diferentes infecções clínicas em animais domésticos (SALERNO & PAES, 2016).

P. multocida possui cinco sorogrupos (A, B, D, E, F), identificados com base na antigenicidade dos polissacarídeos capsulares, dos quais o sorogrupo A é o mais comumente encontrado nas espécies domésticas (QUINN et al., 2011). Ainda, o gênero *Pasteurella* pode ser subdividido em subespécies, das quais *P. multocida* subesp. *multocida* e *P. multocida* subesp. *séptica* merecem destaque nas infecções em felinos domésticos (LLORET et al., 2013).

2.2 Epidemiologia

Microrganismos do gênero *Pasteurella* habitam a região oronasal de animais domésticos). Estima-se que esta bactéria possa ser encontrada na microbiota bucal de 52 a 99% dos gatos (GREENE & GOLDSTAIN, 2012; LLORET et al., 2013). *P. multocida* predomina na microbiota bucal de gatos saudáveis e, portanto, têm sido isoladas de ferimentos em humanos secundários a mordedura de gatos (GREENE & GOLDSTAIN, 2012; LLORET et al., 2013).

A pasteurelose em animais ocorre em todo o mundo, embora apresente maior ocorrência em países de clima frio e temperado (SALERNO & PAES, 2016). O micro-organismo pode acometer diferentes espécies de animais e não possui predileção por sexo, embora seja mais grave e frequente em animais jovens (SALERNO & PAES, 2016).

Particularmente em animais de companhia, a pasteurelose está relacionada principalmente à inoculação cutânea do agente por mordeduras e arranhões, ou inalação do patógeno (SYKES, 2022). Gatos possuem dentes finos e afiados, e hábito de disputas por fêmeas e brigas hierárquicas, que favorecem a ocorrência de lesões cutâneas após a mordedura de felinos (HARASEN & LITTLE, 2015; SOUZA & NEW JR, 2015). Os abscessos causados por espécies de *Pasteurella* são relatados com maior frequência na espécie felina quando comparados aos cães (SYKES, 2022).

As unhas também podem ser responsáveis por transmitir o agente, pois os gatos apresentam hábito de autolimpeza e lambedura das próprias patas, fato

que pode propiciar a presença da bactéria no leito ungueal e a transmissão por arranhaduras (GREENE & GOLDSTAIN, 2012).

2.3 Patogenia

Muitos agentes que habitam microbiotas de animais podem exercer efeito patogênico, em casos de deficiências da resposta imune do hospedeiro (KUBATZKY, 2012). Neste contexto, as espécies de *Pasteurella* são encontradas na mucosa orofaríngea e trato respiratório alto dos felinos e, por vezes, desenvolvem efeito patogênico de modo oportunista e secundário a comorbidades, que determinam imunossupressão ou debilidade orgânica do hospedeiro (GYLES et al., 2010).

O patógeno possui vários mecanismos de virulência, incluindo a captação de íons ferro, presença de lipopolissacarídeos de membrana, cápsula, fatores de aderência de superfície (fímbrias) e enzimas (neuraminidases, hialuronidases e proteases), que favorecem a invasão das células do hospedeiro. Certos isolados virulentos também apresentam dermonecrotinas (WILSON & HO, 2013).

P. multocida produz enzimas hidrolíticas que facilitam a aquisição de nutrientes, além das hialuronidases, presentes em casos de septicemia hemorrágica (WILSON & HO, 2013; SALERNO & PAES, 2016). As fímbrias são responsáveis pela aderência às mucosas, enquanto a cápsula dificulta a fagocitose. As neuraminidases ou sialidases são enzimas responsáveis por secretar o ácido siálico, que limita a defesa do hospedeiro, bloqueando a ação da mucina no trato respiratório (WILSON & HO, 2013; SALERNO & PAES, 2016).

O patógeno também produz leucotoxinas, que alteram a função e inativam os leucócitos (principalmente neutrófilos) e plaquetas, além de apresentarem efeito tóxico para células endoteliais (SALERNO & PAES, 2016). Com a evolução da infecção, ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios e enzimas lisossômicas, que exacerbam a inflamação e a necrose tecidual (SALERNO & PAES, 2016).

Podem ocorrer infecções de diferentes níveis de gravidade, que variam desde abscessos cutâneos e afecções respiratórias leves até casos graves de

pneumonia ou sepse. Toxinas produzidas pelo patógeno aumentam a permeabilidade vascular e exsudação tecidual, evoluindo para processos inflamatórios supurativos, por alta quimiotaxia de fagócitos, resultando em elevadas taxas de fatalidade em pneumonia, fibroses e extensas áreas de abscessos na pele e em órgãos viscerais (FERREIRA, 2011).

2.4 Clínica

Os principais sinais clínicos na pasteurelose em gatos domésticos são representados por abscessos cutâneos, lesões na cavidade oral, pneumonia, efusão pleural, abscessos em órgãos e septicemia (LLORET et al., 2013). O prognóstico é considerado bom nos casos exclusivamente cutâneos, e reservado nos casos sistêmicos (LLORET et al., 2013).

2.4.1 Abscessos

Os abscessos em gatos podem ser localizados na pele (isolados ou sob a forma de flegmões) ou em órgãos. Geralmente são acompanhados de sinais de febre (39,7°C a 40,6°C), inapetência/anorexia e linfonodomegalia regional. Os abscessos se localizam principalmente em regiões mais expostas no momento das brigas, como membros, face, região dorso torácica e base da cauda (GREENE, 2012).

Nas lesões abscedantes ocorre sensibilidade e eritema local, com áreas flutuantes, e presença de secreção purulenta branco-amarelada de odor fétido (GREENE, 2012; HARASEN & LITTLE, 2015). Gatos que apresentam abscessos de forma recorrente usualmente estão coinfectados com patógenos imunossupressores ou doenças imunodepressoras (neoplasias), geralmente causados por isolados multirresistentes (GREENE, 2012).

2.4.2 Infecções respiratórias

P. multocida tem sido isolada de felinos com secreção nasal mucopurulenta ou francamente purulenta, geralmente de animais coinfectados com agentes imunossupressores (vírus da imunodeficiência felina ou vírus da leucemia felina) ou com debilidade orgânica (LLORET et al., 2013; QUIMBY & LAPPIN, 2015).

As manifestações respiratórias na pasteurelose em gatos podem ser variáveis, incluindo inflamações agudas a crônicas, que ocorrem no trato superior sob a forma de rinite (irritação e inflamação da mucosa nasal e secreções nasais), faringite, tonsilite e, com menor frequência, acometendo o trato respiratório inferior, causando pneumonia (LLORET et al., 2013).

Os sinais respiratórios incluem espirros, secreções nasais purulentas, rinite, dispneia e febre, podendo evoluir para sepse (WILSON & HO, 2013).

2.4.3 Infecções de orofaringe

A gengivite e periodontite são outras formas comuns de afecções em felinos causadas por espécies de *Pasteurella*, devido a presença dos micro-organismos na cavidade bucal, podendo surgir sem a coinfecção por retrovírus (DOLIESLAGER, 2011; GREENE, 2012; HARASEN & LITTLE, 2015). As infecções são observadas sob a forma de ulcerações ou abscessos em gengiva, língua, lábios e faringe (autor). Os animais apresentam sensibilidade dolorosa local, além de apatia, disfagia, halitose, salivação excessiva e perda de peso (DOLIESLAGER, 2011; GREENE, 2012; HARASEN & LITTLE, 2015).

2.4.4 Outras infecções

Espécies de *Pasteurella* também têm sido relatadas como agentes causais de efusão pleural, osteomielite, otite, peritonite e sepse em felinos (LLORET et al., 2013; HARASEN & LITTLE, 2015).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de rotina da pasteurelose felina baseia-se nos achados clínico-epidemiológicos, exames hematológicos e de imagem, cultivo, identificação microbiológica e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados (LOVE et al., 2000; GREENE, 2012). Em casos de abscessos deve-se considerar na anamnese a ocorrência de brigas e ferimentos prévios nas lesões cutâneas. Nesses casos, o exame clínico revela lesões locais abscedantes e/ou infecções difusas em face, tórax, membros, região dorsal e na base da cauda (LOVE et al., 2000; GREENE, 2012).

O leucograma revela leucocitose por neutrofilia, enquanto no eritrograma pode haver anemia arregenerativa em resposta à inflamação crônica (autor). Também são realizados exames de imagem (ultrassonografia e radiografia) nos gatos com lesões respiratórias ou disseminadas, visando observar a extensão das lesões e o acúmulo de líquidos (pus) em tecidos moles (GREENE, 2012).

A punção de abscessos e o cultivo de materiais (sangue, abscessos, fragmentos de órgãos, secreção auricular, lavados transtraqueais, exsudato conjuntival, pleural, abdominal e de seios nasais) são recomendados no isolamento do agente e para se obter o diagnóstico definitivo (SALERNO & PAES, 2016).

Nos casos de acometimento respiratório, o diagnóstico deve ser realizado com base na cultura de amostras de lavados transtraqueais, enquanto nas infecções cutâneas e de órgãos se recomenda a citologia ou biópsia, cultivo microbiológico e exames histopatológicos (HARASEN & LITTLE, 2015; QUIMBY & LAPPIN, 2015).

A identificação de rotina das pasteurelas tem sido realizada com base no cultivo bacteriológico e identificação das espécies utilizando métodos fenotípicos (WILSON & HO, 2013).

Nas últimas décadas, métodos de diagnóstico molecular têm sido utilizados no diagnóstico da pasteurelose em animais, incluindo PCR convencional e *real-*

time PCR, espectrometria de massas e sequenciamento (WANG et al., 2019; PASCUAL-GARRIGOS et al., 2021; UJVÁRI et al., 2022). No entanto, na pasteurelose em gatos, a maioria das descrições têm sido sob a forma de relatos de caso, utilizando métodos clássicos de diagnóstico fenotípico para identificar as espécies do patógeno (FOSTER et al., 2004; FRESHWATER, A., 2008; WANG et al., 2009; VERONEZI, T. M., 2017; FERREIRA et al., 2019)

2.5.1 *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* – MALDI-TOF MS

A espectrometria de massas é uma técnica molecular utilizada na identificação de espécies de bactérias e leveduras (PATEL, 2014), que consiste na ionização de proteínas, utilizada para estimar a proporção de massa por carga traduzida na forma de espectros, que são únicos para cada agente (SINGHAL et al., 2015).

Em medicina veterinária, a título de exemplo, a técnica tem sido utilizada no diagnóstico de agentes causadores de mastite em vacas em certos países (NONNEMANN et al., 2019), inclusive no Brasil (BARREIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014). A espectrometria de massas também tem sido empregada no diagnóstico de agentes causais de infecções do trato urinário em suínos (MORENO et al., 2018) e na identificação da microbiota de origem bacteriana e fúngica da cavidade oral de cães (PORTILHO, 2020).

Na pasteurelose em gatos, a identificação do patógeno em vários estudos está restrita em nível de gênero da bactéria, utilizando testes fenotípicos (bioquímicos) clássicos (WALKER et al., 2000; FOSTER et al., 2004; FRESHWATER, 2008; WANG et al., 2009; GIORDANO et al., 2015; AWOSILE et al., 2018), enquanto número reduzido de estudos tem firmado o diagnóstico com base em técnicas moleculares (SHIRZAD-ASKI & TABATABAEI, 2016; NAKANISHI et al., 2019; REIS, 2019).

2.6 Tratamento

Recomenda-se que o tratamento seja realizado com base no isolamento do agente, com respaldo em testes *in vitro* de sensibilidade microbiana, que podem nortear a escolha dos antimicrobianos e reduzir a ocorrência de resistência bacteriana (SALERNO & PAES, 2016).

Em geral, as afecções por *Pasteurella* sp. são tratadas com antimicrobianos de amplo espectro (WILSON & HO, 2013), embora o agente seja relativamente sensível a certa variedade de antimicrobianos (HARASEN & LITTLE, 2015).

Nos casos de ferimentos por mordeduras ou arranhaduras de gatos deve ser realizada a antisepsia do ferimento (GREENE, 2012; SOUZA & NEW JR, 2015). O entorno da região lesionada deve ser submetido à tricotomia e, se possível, realizar a excisão cirúrgica do conteúdo purulento (autor). Também são preconizadas medidas como limpeza diária local com antissépticos e debridamento da região acometida (GREENE, 2012; SOUZA & NEW JR, 2015).

Derivados beta-lactâmicos, tetraciclina e fluorquinolonas têm sido os principais grupos de antimicrobianos utilizados no tratamento de animais domésticos acometidos por pasteurelose. Particularmente nos felinos, se recomenda a associação entre amoxicilina com ácido clavulânico (20/mg/kg, a cada 12 horas, durante 5 a 7 dias, via oral) ou ampicilina (20/mg/kg, a cada 8 horas, durante 5 a 7 dias, via oral). Ainda, são indicadas a doxiciclina (5 mg/kg, a cada 12 horas, durante 5 a 7 dias, via oral) ou cefadroxila (22mg/kg, a cada 12 horas, durante 5 a 7 dias, via oral) (GREENE & GOLDSTAIN, 2012).

Em casos graves de pasteurelose em felinos, como peritonite e osteomielite, o tratamento é preconizado por período prolongado, entre 4 e 6 semanas (HARASEN & LITTLE, 2015).

Em humanos, os cultivos de feridas infectadas por espécies de *Pasteurella* isoladas de mordidas de gatos têm revelado >95% de sensibilidade dos isolados a benzilpenicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazolina e eritromicina (HARASEN & LITTLE, 2015) embora, na última década, seja

descrita aumento da resistência *in vitro* de *P. multocida* às penicilinas e tetraciclina, provavelmente pelo uso, há décadas, destes fármacos em medicina veterinária (SALERNO & PAES, 2016).

2.7 Controle e profilaxia

Devido ao comportamento oportunista da bactéria e a presença como habitante de mucosas, na prática, não existem medidas específicas recomendadas no controle ou profilaxia da doença em gatos (SOUZA & NEW JR, 2015).

Em geral, recomenda-se que os gatos sejam mantidos dentro do ambiente domiciliar e alimentados com ração comercial processada, além de terem as unhas devem ser cortadas periodicamente para prevenção de possíveis infecções de humanos e outros animais por arranhaduras (SOUZA & NEW JR, 2015).

É indicada a castração, particularmente para gatos machos, visando à redução da procura por fêmeas, comportamento de fuga e do hábito de disputas hierárquicas e com outros gatos por fêmeas (GREENE, 2012).

Acidentes relacionados a mordeduras e arranhaduras de gatos em outras espécies domésticas, ou mesmo em humanos, devem ser tratados precocemente, em virtude da natureza polimicrobiana da microbiota bucal dos gatos, incluindo por espécies de *Pasteurella* (SOUZA & NEW JR, 2015).

2.8 Reflexos em Saúde Única

As infecções por *P. multocida* apresentam potencial zoonótico (LLORET et al., 2013). Em humanos, a pasteurelose ocorre de forma secundária a acidentes por mordeduras e arranhões em animais de companhia, por lambeduras ou contato com secreções contaminadas pela bactéria (TALAN et al., 1999; LIU et al., 2003; GREENE & GOLDSTAIN, 2012; WILSON & HO, 2013; SALERNO & PAES, 2016).

Os gatos são a espécie animal mais comumente relacionada nas infecções em humanos por pasteurelas (TALAN et al., 1999; LIU et al., 2003), posto que cerca de 80% das mordidas de gatos podem se tornar infectadas, particularmente por *P. multocida* (HARASEN & LITTLE, 2015). Ainda, os felinos domésticos apresentam a peculiaridade de dentição de espessura fina, que facilita lesões perfurocortantes profundas nos tecidos, favorecendo a inoculação do patógeno pela saliva, que pode gerar lesões cutâneas e complicações clínicas por disseminação sistêmica (KHEIRAN et al., 2019; LOVE, 2000), reforçando a relevância em Saúde Única do presente estudo, em virtude do estreito contato dos tutores com os animais de companhia.

Tal dado é relevante no contexto atual, no qual a multirresistência aos antibacterianos é considerado problema emergente, de ordem mundial, pela Organização Mundial da Saúde. Neste contexto, Wei et al. (2021), relataram o primeiro caso de infecção em humanos por *P. multocida* resistente à amoxicilina/ácido clavulânico, no qual a bactéria foi isolada de abscesso causado por mordedura de gato.

Médicos veterinários e outros profissionais relacionados à saúde animal apresentam risco ocupacional, em virtude do contato direto e manipulação constante de animais, favorecendo os riscos de acidentes ou agressões com inoculações traumáticas de bactérias, incluindo espécies de pasteurela (GREENE, 2012).

A pasteurelose em humanos é mais comum, e grave, em crianças, idosos, indivíduos com comorbidades e/ou imunossuprimidos, embora também seja relatada em pessoas imunocompetentes (LLORET et al., 2013). Manifesta-se geralmente sob a forma de abscessos, artrite séptica, meningite, endocardite, peritonite, pneumonia e, ocasionalmente, sepse (TALAN et al., 1999; LIU et al., 2003; WILSON & HO, 2013). *P. multocida* representa a principal espécie isolada de casos graves em humanos (WILSON & HO, 2013; SOUZA & NEW JR, 2015).

Nos casos de pasteurelose em humanos - transmitida por animais domésticos - estima-se mortalidade entre 25 e 30% dos pacientes, principalmente entre os que desenvolvem infecções sistêmicas (WILSON & HO, 2013). Em todo o mundo são relatados cerca de 20 a 30 mortes humanas/ano

por pasteurelose e, na maioria dos casos, os pacientes têm sido vitimados por complicações clínicas, com histórico de contato ou agressões por animais de companhia (WILSON & HO, 2013).

Espécies de *Pasteurella* figuram dentre as bactérias mais comumente identificadas em humanos a partir de amostras de ferimentos secundários a mordeduras de gatos (LLORET et al., 2013; MIRZAI et al., 2019; MU et al., 2020). Estes isolados obtidos de tutores e dos felinos do mesmo domicílio têm apresentado similaridade de virulência e do perfil *in vitro* de sensibilidade microbiana, indicando que os gatos são reservatórios, em potencial, para infecções pelo patógeno em humanos e outros animais (UJVÁRI et al., 2019).

Considerando o aumento da população de gatos domésticos em todo o mundo, incluindo no Brasil, a presença de pasteurelas como habitantes da microbiota oral e do trato respiratório superior dos felinos, o comportamento oportunista e o potencial zoonótico do agente, o contato estreito dos tutores e animais de companhia, e as descrições com pasteurelose felina praticamente restritas aos relatos de caso, com identificação do agente utilizando métodos fenotípicos de diagnóstico; foi realizado o presente estudo com intuito de investigar aspectos clinico-epidemiológicos, o perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e o diagnóstico de espécies de *Pasteurella* por espectrometria de massas, em gatos domésticos acometidos por diferentes infecções clínicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar espécies de *Pasteurella* utilizando a espectrometria de massas (MALDI TOF-MS), em gatos domésticos com diferentes infecções clínicas.

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar a ocorrência da pasteurelose em felinos em relação às desordens clínicas e certos aspectos epidemiológicos (idade, sexo, raça, sazonalidade, desfecho);
- ✓ Investigar o perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* e a ocorrência de resistência múltipla aos antimicrobianos utilizados no tratamento da pasteurelose felina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP), sob número 0224/2021 (Anexo 1).

4.2 Animais e isolados de *Pasteurella*

Foram utilizados isolados de *Pasteurella* obtidos, por conveniência, de gatos provenientes da rotina de atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP/Botucatu, SP, e de clínicas particulares da região, encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico Microbiológico, do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ/UNESP/Botucatu, SP, entre 2021 e 2022, com diferentes aspectos clínicos.

Os diferentes tipos de espécimes clínicos foram colhidos após o uso de soluções antissépticas, mantidos em refrigeração (4-8°C) e encaminhados para o cultivo microbiológico no laboratório supracitado.

Dados de raça e sexo dos animais, afecções clínicas e desfecho (cura ou morte) foram obtidos dos animais amostrados. Foram acessados também os períodos do ano de ocorrência dos casos, a saber: primavera (setembro a novembro), verão (dezembro a fevereiro), outono (março a maio) e inverno (junho a agosto). Os dados de idade dos animais foram estratificados conforme segue: <1 ano de idade, 1 a ≤ 5 anos, >5 a ≤ 10 anos, e >10 anos (Ribeiro et al., 2022), considerados, jovens, adultos-jovens, adultos e idosos (senectos), respectivamente.

Foram avaliados se os animais eram intradomiciliados restritos, semi-domiciliados, animais de rua ou ferais, ou se não foi possível obter esta informação.

4.3 Diagnóstico de Imunodeficiência Viral Felina (Feline Immunodeficiency Virus-FIV) e Leucemia Viral Felina (Feline Leukemia Virus - FeLV)

Foi investigado o *status* de diagnóstico recente (30 dias antes do isolamento de *Pasteurella* spp.) de FIV e FeLV nos gatos domésticos amostrados. O diagnóstico foi realizado a partir do sangue total colhido dos animais amostrados, utilizando o *kit* comercial Snap Test[®] segundo as recomendações do fabricante (IDEXX Brasil Laboratórios Ltda[®], Itajaí, SC), visando a detecção de antígenos de FeLV e anticorpos contra FIV.

4.4 Cultivo microbiológico

Todos os espécimes clínicos (lavado transtraqueal, urina, secreção de abscessos e conjuntivas) foram cultivados em condições de aerobiose no meio de ágar sangue bovino (Oxoid[®], São Paulo, Brasil) e em meio seletivo de MacConkey (Oxoid[®], São Paulo, Brasil), incubados a 37°C, avaliados a cada 24 horas, mantidos por 72 horas. Os micro-organismos isolados foram, inicialmente, identificados com base em características morfológicas e bioquímicas (QUINN et al, 2011) e, posteriormente, encaminhados para o diagnóstico por MALDI-TOF MS, visando a identificação em nível de espécies.

Foram consideradas infecções, isolamentos com ≥ 10 unidades formadoras de colônias (UFC) de micro-organismos.

4.5 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF MS

Isolados compatíveis com espécies de *Pasteurella* foram submetidos à espectrometria de massas para confirmação diagnóstica. Foi utilizado a técnica de MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics[™], Bremen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Três a quatro colônias recém isoladas (24 a 48h) em ágar sangue foram submetidas à extração com 20-40µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas,

visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros bacterianos. Cerca de 15 minutos depois, foi adicionado em cada amostra 20-40µL de acetomil (100% P.A.) na mesma proporção do ácido fórmico (1:1) e centrifugado. Em seguida, 1µL da solução de cada amostra foi adicionada em placas específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha) e mantida por cerca de 20 minutos para secar em temperatura ambiente. Os orifícios com as amostras secas foram cobertos com 1µL de solução matriz (ácido 2-ciano-4- hidroxicinâmico diluído a 50% de acetomil e 2,5% de ácido trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do equipamento MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos espectros foram analisados entre 2.000-20.000m/z, usando o software FlexControl 3.3.

A caracterização em nível gênero e espécie dos micro-organismos foi considerada para isolados com espectros ≥ 1.7 e ≥ 2.0 , respectivamente (BARREIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014).

4.6 Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro*

Todos os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana *in vitro* pelo método de difusão com discos, segundo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2020a,b), utilizando 11 antimicrobianos pertencentes a cinco grupos indicados para o tratamento de infecções por espécies de *Pasteurella* em felinos, conforme segue: 1) aminoglicosídeos (amicacina, 30 µg), 2) beta-lactâmicos e derivados (amoxicilina/ácido clavulânico, 30 µg; ampicilina, 10 µg; cefalexina, 30 µg; ceftriaxona, 30 µg; 3) fluoroquinolonas (ciprofloxacino, 5 µg; levofloxacino 5 µg; marbofloxacino, 5 µg; norfloxacino, 10 µg); 4) macrolídeos (azitromicina, 15 µg); 5) tetraciclina (doxiciclina, 30 µg). Isolados resistentes a ≥ 3 antimicrobianos de classes distintas foram considerados multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.7 Hematócrito e número total de leucócitos

Foram investigados os dados de hematócrito e número total de leucócitos entre os gatos domésticos amostrados. Foram considerados como parâmetros normais da espécie entre 24-47% para o hematócrito e $5,5-19,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ para o número total de leucócitos (leucometria). A dosagem do hematócrito e contagem do número total de leucócitos foram realizadas com base na centrifugação de capilar do sangue total e diluição de sangue total em câmara de Neubauer (microscopia óptica), respectivamente (THRALL et al., 2017).

4.8 Análise estatística

Associações entre as variáveis categóricas (sexo e idade dos animais, estações do ano, acesso a rua, desfecho), diferentes infecções clínicas e identificação das espécies de *Pasteurella* foram avaliadas com base nos testes de Qui-quadrado ou Fisher. Para as variáveis contínuas (hematócrito e número de leucócitos) foram realizados testes não paramétricos (Wilcoxon ou Kruskal-Wallis) visando verificar diferenças estatísticas entre as medianas destes dados com as variáveis explanatórias. Foram consideradas diferenças estatísticas para valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do software SAS *Ondemand For Academics* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS

Foram isoladas espécies de *Pasteurella* de 26 gatos com diferentes afecções clínicas (Anexo 2).

5.1 Dados epidemiológicos dos gatos amostrados

Dos 26 gatos amostrados, 92% (24/26) não possuíam raça definida, exceto dois animais (2/26=8%) da raça Maine Coon e Exótico Pelo Curto.

A idade dos animais variou entre 2 meses e 16 anos, com a média de 5,5 anos. Foi possível obter a informação da idade de 88,5% (23/26) dos animais, enquanto 11,5% (3/26) tinham idade desconhecida. Entre os gatos com idade conhecida, 19% (5/26) tinham < 1 ano (jovens), 19% (5/26) entre 1 e ≤ 5 anos (adultos-jovens), 23% (6/26) > 5 e ≤ 10 anos (adultos) e 27% (7/26) > 10 anos (velhos).

Do total de animais, 53,8% (14/26) tinham acesso a rua, enquanto 30,8% (8/26) não tinham acesso a rua e 15,4% (4/26) não foi possível obter esta informação.

Do total de gatos amostrados, 65% (17/26) eram machos e 34% (9/26) fêmeas. Em relação ao período do ano em que as amostras foram coletadas, 34% (9/26) foram na primavera, 26% (7/26) no verão, 11% (3/26) no outono e 26% (7/26) no inverno.

Informações sobre o desfecho foram obtidas de 57% (15/26) dos animais. Destes, 53% (8/15) evoluíram para óbito (sepse n=4, pneumonia n=1, neoplasias n=3), enquanto os demais 53% (8/15) se recuperaram após o tratamento (infecções cutâneas).

Dentre os 26 felinos, em somente 15,4% (4/26) tinham sido testados recentemente (<60 dias) para FIV e FeLV, dos quais dois machos (2/4=50%) foram reagentes.

Não foram observadas associações significantes entre as variáveis categóricas (sexo e idade dos animais, estações do ano, acesso a rua,

desfecho), manifestações clínicas e identificação das espécies de *Pasteurella*, bem como para as variáveis contínuas (hematócrito e número de leucócitos).

5.2 Identificação de espécies de *Pasteurella*

Dentre os 26 gatos, foram isoladas colônias de aspecto arredondado, mucoides, acinzentadas, não hemolíticas, com cerca de 1mm de diâmetro, entre 24 e 48 horas, no meio de ágar sangue, compatíveis fenotipicamente com espécies do gênero *Pasteurella* (QUINN et al., 2011).

Na técnica de MALDI-TOF MS foram detectadas três espécies de *Pasteurella*, com predomínio de *Pasteurella multocida* (23/26=88,4%), seguido em menor frequência de *Pasteurella dagmatis* (2/26=7,7%) e *Pasteurella canis* (1/26=3,8%) (Tabela 1).

5.3 Afecções clínicas

Dentre os espécimes clínicos com isolamento de pasteurelas, 42% (11/26) foram provenientes de abscessos, 11% (3/26) pneumonia, 11% (3/26) conjuntivite, 11% (3/26) feridas abertas, 7% (2/26) infecções do trato urinário, 7% (2/26) efusão pleural, 3% (1/26) piometra e 3% (1/26) infecção secundária a neoplasia (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação de espécies de *Pasteurella* por espectrometria de massas¹ em gatos domésticos com diferentes afecções clínicas. Botucatu, SP (2019-2023)

Afecções	Abscessos cutâneos	Pneumonia	Conjuntivite	Infecções urinárias	Feridas abertas	Outras ²	Total
Espécies	N / Total (%)	N / Total (%)	N / Total (%)	N / Total (%)	N / Total (%)	N / Total (%)	N / Total (%)
<i>P. multocida</i>	10/11 (90,9)	3/3 (100)	1/3 (33,3)	2/2 (100%)	3/3 (100)	4/4 (100)	23/26 (88)
<i>P. canis</i>	0/11 (0)	0/3 (0)	1/3 (33,3)	0/2 (0%)	0/2 (0)	0/3 (0)	1/26 (3)
<i>P. dagmatis</i>	1/11 (9)	0/3 (0)	1/3 (33,3)	0/2 (0%)	0/2 (0)	0/3 (0)	2/26 (7)
Total	11/26 (35)	3/26 (11)	3/26 (11)	2/26 (7)	3/26 (11)	4/26 (15)	26/26 (100)

N = número de amostras

¹ Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS

² Efusão pleural (2/26=7%), piometra (1/26=3%), infecção secundária à neoplasia (1/26=3%)

5.4 Teste de sensibilidade microbiana *in vitro*

Exceto amicacina, azitromicina e norfloxacino, todos os demais antimicrobianos apresentaram $\geq 95\%$ de eficácia *in vitro* diante dos isolados. A maior resistência dos isolados foi observada para amicacina (10/26=38%), seguida de azitromicina e norfloxacino (Tabela 2). Não foram observados isolados multirresistentes de *Pasteurella*.

TABELA 2. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* (método de difusão com discos) em 26 isolados de *Pasteurella* obtidos de gatos domésticos com diferentes afecções clínicas. Botucatu, SP (2021-2023).

Classes	Antimicrobianos	Sensibilidade		
		S (%)	PS (%)	R (%)
Aminoglicosídeos	Amicacina	9 (34)	7 (26)	10 (38)
Beta lactâmicos e derivados	Amoxicilina/ácido clavulânico	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Ampicilina	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Cefalexina	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Ceftriaxona	26 (100)	0 (0)	0 (0)
Fluorquinolonas	Ciprofloxacino	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Levofloxacino	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Marbofloxacino	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Norfloxacino	25 (96)	0 (0)	1 (3)
Macrolídeos	Azitromicina	21 (80)	3 (11,5)	2 (7,7)
Tetraciclinas	Doxiciclina	26 (100)	0 (0)	0 (0)
	Tetraciclina	26 (100)	0 (0)	0 (0)

S=sensível, PS=parcialmente sensível, R=resistente

5.5 Hematócrito e número total de leucócitos

Os achados de hematócrito e número de leucócitos totais estavam disponíveis em 46,1% (12/26) dos gatos amostrados, posto que muitos dos animais incluídos no estudo não tinham fichas de controle de atendimento clínico. Destes, 83% (10/12) apresentaram valores de hematócrito considerados normais para a espécie, enquanto 17% (2/12) apresentaram valores abaixo do limite normal. Na contagem de leucócitos totais, 67% (8/12) revelaram contagens consideradas normais para espécie, enquanto 33% (4/12) apresentaram leucocitose.

6. DISCUSSÃO

O Brasil possui uma das maiores populações de animais de companhia do mundo, com aumento substancial da população de gatos domésticos, semidomiciliados ou errantes nos últimos anos (MOUTINHO et al., 2019; INSTITUTO PET BRASIL, 2022). Apesar dos benefícios psicossociais e de bem estar dos tutores com a presença dos felinos domésticos nos domicílios, o contato estreito destes com os felinos pode favorecer a transmissão de patógenos virulentos (ROCHA et al., 2021; ZORAYD et al., 2022), de potencial zoonótico, entre estes animais de companhia e os humanos (ESCH et al., 2013); fato que merece preocupação no contexto de Saúde Coletiva (UJVÁRI et al., 2019; MIRZAI et al., 2019; MU et al., 2020), e constituiu uma das principais motivações do presente estudo.

No presente estudo foi investigada por proteômica (espectrometria de massas) a identificação de espécies de *Pasteurella* em 26 gatos domésticos com diferentes infecções clínicas, que revelou maior frequência de detecção da espécie *P. multocida*, com predomínio de lesões cutâneas, em gatos machos, e evolução fatal nos casos de infecções sistêmicas.

As pasteurelas constituem grupo de bactérias que habitam a microbiota oral e do trato respiratório superior de animais domésticos, cujas infecções em animais de companhia e de produção estão relacionadas ao comportamento oportunista do patógeno (GYLES et al., 2010; ABRAHAMIAN & GOLDSTEIN, 2011; SALERNO & PAES, 2016; REIS, 2019; SYKES, 2022). Mais de 15 espécies de *Pasteurella* são conhecidas, embora *P. multocida*, *P. dagmatis* e *P. stomatis* sejam mais frequentemente isoladas de diferentes infecções clínicas em animais domésticos (QUINN et al., 2011; SALERNO & PAES, 2016; SYKES, 2022). Nos 26 gatos amostrados foi identificado *P. multocida* em 88,4% dos animais com base na espectrometria de massas seguido, em menor frequência, de 7,7% e 3,8% de detecção de *P. dagmatis* e *P. canis*, respectivamente. Tal resultado reforça o predomínio de *P. multocida* como a principal espécie de *Pasteurella* nas infecções clínicas em gatos domésticos (LLORET et al., 2013;

SYKES, 2022). Vale ressaltar que as três espécies estão presentes e são isoladas da cavidade oronasal de gatos saudáveis, pertencendo ao grupo de bactérias da microbiota local (TALAN et al., 1999).

Diferentes fatores epidemiológicos devem ser considerados nas infecções por pasteurelas em gatos domésticos, incluindo sexo, idade e raça dos animais, hábito territorial dos felinos (disputas por dominância no ambiente, alimento e fêmeas no estro) e acesso ao ambiente externo do domicílio (LOVE, 2000; WALKER et al., 2000; VERONEZI, 2017; WANG et al., 2019).

Do total de 26 gatos amostrados, 92% não possuíam raça definida, exceto dois animais (8%) da raça Maine Coon e Exótico de pelo curto, fato que dificultou avaliar a influência das peculiaridades da variável raça nas infecções por *Pasteurella*. Tal achado pode ser atribuído, em parte, ao maior predomínio de gatos mestiços nos domicílios e ao aumento da adoção de animais errantes no Brasil (JUNQUEIRA, 2017; MOUTINHO et al., 2019), ou ao perfil socioeconômico dos tutores dos animais estudados, encaminhados ao serviço de diagnóstico microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, que, usualmente, é constituído por tutores de baixo poder aquisitivo (ALMEIDA, 2023) que, dificilmente, adquirem gatos a partir de compras diretas.

Foi possível obter dados de idade de 88,5% (23/26) do total de gatos estudados. Destes, ampla variação de idade foi observada, com animais acometidos entre 2 meses e 16 anos, com média de 5,5 anos, indicando que a pasteurelose em felinos domésticos pode ocorrer em qualquer faixa etária. No entanto, dentre os 23 gatos com idade conhecida, foi observada distribuição relativamente equivalente das infecções por espécies de *Pasteurella* entre os animais considerados jovens (19%), adultos-jovens (19%) e adultos (23%), e alta ocorrência em animais velhos (27%), embora sem significância estatística. Dos 27% de animais considerados velhos, houve uma correlação equilibrada entre desfecho letal e faixa etária, em que 5/10 (50%) evoluíram ao óbito natural ou induzido, decorrente das complicações da enfermidade base e coinfeções.

Ainda, mais de 50% dos animais amostrados tinham histórico de acesso a rua e mais de 60% eram machos. Certa equivalência na distribuição de ocorrência das infecções entre gatos considerados de idade jovem a adulta, com

predomínio em machos com acesso a rua, concorda com estudos similares envolvendo a pasteurelose em gatos domésticos (FRESHWATER et al., 2008; LLORET et al., 2013; MOUTINHO et al., 2019). Tal resultado poderia ser atribuído ao livre acesso a rua de gatos machos não castrados, em idade reprodutiva, que poderia favorecer infecções respiratórias pelo contato com outros animais fora do domicílio. Ainda, o acesso a rua poderia favorecer lesões cutâneas secundárias a mordeduras, devido aos hábitos territoriais de gatos machos, comumente envolvidos em disputas por alimento, por fêmeas no estro e/ou pela dominância do território, propiciando a inoculação de espécies de *Pasteurella*, habitantes da microbiota da cavidade oral e respiratória superior de gatos domésticos, além do leito ungueal (LOVE, 2000; WALKER et al., 200; VERONEZI, 2017; WANG et al., 2019).

Do total de 26 gatos incluídos no presente estudo, 60% apresentaram infecções clínicas no período da primavera e verão. A alta ocorrência de infecções nestas estações do ano (ainda que sem significância estatística) poderia estar relacionada ao período reprodutivo das gatas domésticas, que apresenta maior número de estros em períodos de dias mais longos (primavera e verão) (JOHNSTON et al., 2001), favorecendo a procura por machos semidomiciliados ou errantes, que poderiam se envolver em disputas pelas fêmeas, e a ocorrência de lesões cutâneas por mordeduras e arranhaduras (LOVE, 2000; WALKER et al., 200; VERONEZI, 2017; WANG et al., 2019).

Lameduras também figuram entre as possibilidades de infecções por *Pasteurella* em felinos domésticos, posto que o hábito de auto limpeza ou asseio (*grooming*) em áreas cutâneas com soluções de continuidade pode representar via alternativa de transmissão do agente, a partir da contaminação de lesões pela própria saliva do animal (GYLES et al., 2010). Em ambas situações, representadas pela mordedura ou contaminação de feridas cutâneas, as lesões comumente evoluem para formação de abscessos cutâneos, celulite, ou disseminação sistêmica, com possibilidade de septicemia e formação de abscessos em órgãos (QUINN et al., 2011; QUIMBY & LAPPIN et al., 2015; SALERNO & PAES, 2016).

Abscessos cutâneos (42%) foram as apresentações clínicas mais frequentes nos 26 gatos amostrados, seguida de pneumonia (11%), feridas abertas (11%) e conjuntivite (11%), além de uma variedade de outras manifestações clínicas, e.g., efusão pleural, piometra e infecção do trato urinário, reforçando o comportamento oportunista das espécies de *Pasteurella* nas infecções em gatos domésticos (GYLES et al., 2010; QUINN et al., 2011; SIKES, 2022). O predomínio de abscessos cutâneos nos 26 casos do presente estudo, concorda com estudos similares, nos quais as lesões cutâneas são consideradas a principal manifestação clínica da pasteurelose em felinos domésticos (LLORET et al., 2013; HARASEN & LITTLE, 2015; SYKES, 2022) e, possivelmente, o inóculo traumático do agente a principal via de infecção.

Dados de desfecho dos casos de pasteurelose nos gatos estudados foram obtidos de 61% (16/26) dos animais. Destes, 50% (8/16) evoluíram para óbito ou foi realizada a eutanásia, principalmente em animais acometidos por infecções sistêmicas graves (pneumonia e efusão pleural), reforçando o prognóstico reservado nos casos de disseminação do patógeno ou infecções sistêmicas (HARASEN & LITTLE, 2015; SYKES, 2022).

Apesar da gravidade e do prognóstico reservado de infecções sistêmicas por espécies de *Pasteurella* nos felinos domésticos, as descrições da doença em gatos tem sido principalmente reportadas sob a forma de relatos de casos (DOLIESLAGER, 2011; LLORET et al., 2013; QUIMBY & LAPPIN, 2015), com o diagnóstico restrito em nível de gênero do micro-organismo ou firmado com base em testes fenotípicos clássicos (WALKER et al., 2000; FOSTER et al., 2004; FRESHWATER, 2008; WANG et al., 2009; GIORDANO et al., 2015; AWOSILE et al., 2018). Em contraste, no presente estudo, isolados de *Pasteurella* obtidos de 26 gatos domésticos, com diferentes infecções clínicas, foram diagnosticados molecularmente com base em proteômica (MALDI-TOF MS), que tem se revelado técnica acurada, rápida, de custo acessível, com alto poder discriminatório de espécies bacterianas e de leveduras, favorecendo estudos etioepidemiológicos com micro-organismos de origem animal e humana (KUHNERT et al., 2012; ZANGENAH et al., 2013).

A ocorrência da pasteurelose clínica em gatos tem sido associada com animais coinfectados por doenças debilitantes ou imunossupressivas, *i.e.*, FIV e FeLV (SYKES, 2022). No presente estudo, em somente quatro gatos foi possível obter dados de testes recentes de diagnóstico de FIV e FeLV, dos quais dois animais foram reagentes para FeLV, dificultando avaliar o impacto nos animais estudados da coinfecção de *Pasteurella* com estas doenças imunossupressivas virais.

Os exames hematológicos de hematócrito e contagem de leucócitos totais foram realizados em 12 (46,1%) gatos estudados, que revelaram a maioria dos animais com valores normais de hematócrito (>80%) e 33% com leucocitose. A presença de leucocitose, com ou sem anemia, nos gatos estudados era esperada, em virtude da quimiotaxia induzida por espécies de *Pasteurella* nas infecções em gatos (SALERNO & PAES, 2016; SYKES, 2022). O motivo da baixa taxa de leucocitose, ocorre devido ao maior registro de infecções leves e localizadas nos animais estudados.

Beta-lactâmicos e derivados (amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, ceftriaxona) e tetraciclinas (doxiciclina e tetraciclina) foram os grupos/antimicrobianos que apresentaram 100% de eficácia *in vitro* diante das três espécies de *Pasteurella* isoladas no presente estudo. Ainda, ciprofloxacino, levofloxacino e marbofloxacino (fármacos representantes do grupo das fluorquinolonas), também apresentaram 100% de eficácia diante dos isolados, exceto norfloxacino, que apresentou somente um isolado de *P. multocida* resistente. Esses resultados concordam com estudos similares do perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos em isolados de pasteurelas obtidos de gatos (FRESHWATER, 2008; FERREIRA et al., 2016; REIS, 2019) e indicam que, de modo geral, antimicrobianos pertencentes aos grupos dos beta-lactâmicos, tetraciclinas e fluorquinolonas são alternativas terapêuticas que devem ser consideradas no tratamento da pasteurelose em gatos domésticos, devido ao amplo espectro de ação, principalmente contra gram negativos, e o potencial de perfusão nos diversos tecidos inflamados (LLORET et al., 2013; HARASEN & LITTLE, 2015; SYKES, 2022).

Apesar dos resultados positivos demonstrando elevada sensibilidade a maioria do grupo de antimicrobianos, a discrepância analisada quanto ao prognóstico, se deve ao fato de que, animais que evoluíram pra óbito apresentavam comorbidades, por isso, não coincidiram com os perfis de sensibilidade eficazes. O isolamento de *Pasteurella* teve ação oportunista e secundária, como nos casos neoplásicos.

Ademais, estudo conduzido nos EUA com a identificação etiológica e perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de patógenos em 78 humanos agredidos por mordedura de gatos, revelou que 70% dos isolados de *P. multocida* foram sensíveis a fármacos representantes do grupo dos beta-lactâmicos (amoxicilina/ácido clavulânico e penicilina) (WESTLING et al., (2006).

Em contraste, 38% dos 26 isolados de *Pasteurella* do presente estudo revelaram resistência a amicacina (aminoglicosídeo) e 7,7% a azitromicina (macrolídeos). Se presume que tal resultado de resistência aos dois grupos de antimicrobianos, decorre do uso histórico e de primeira escolha a estes dois compostos, o que gerou certa seleção antimicrobiana para *Pasteurella* spp.

Apesar da eficácia de certos grupos de antimicrobianos nas infecções por pasteurelas em gatos domésticos, recomenda-se que, sempre que possível, os tratamentos sejam realizados com o respaldo de testes de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados, que podem nortear o uso de fármacos eficazes (SALERNO & PAES, 2016) e aumentar as chances de sucesso dos tratamentos (GUIGUÈRE et al., 2013), bem como evitar o uso não racional de antimicrobianos, relacionado ao aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2012), preocupação emergente em Saúde Única (WEI et al., (2021).

Amostragem de conveniência, a não caracterização de sorogrupos/subespécies de *Pasteurella*, e a não investigação de comorbidades e doenças debilitantes (exceto FIV e FeLV) em vários animais estudados podem ser considerados fatores limitantes do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

- ✓ *P. multocida* foi predominantemente isolada dos gatos domésticos, reforçando o envolvimento desta espécie como agente causal primário de diferentes infecções clínicas em felinos de companhia;
- ✓ A presença de grande variedade de infecções clínicas (*i.e.*, abscessos cutâneos, pneumonia, conjuntivite, feridas abertas, piometra, infecção do trato urinário e efusão pleural) observadas nos gatos domésticos, reforça o comportamento oportunista do patógeno na pasteurelose felina;
- ✓ Predomínio de abscessos cutâneos foi observado em gatos machos, com acesso a rua, que poderia ser atribuído a veiculação do patógeno por mordeduras ou arranhaduras secundárias a disputas por alimentos, fêmeas e/ou território;
- ✓ *P. multocida*, *P. dagmatis* e *P. canis* foram as espécies identificadas por proteômica pela técnica de MALDI-TOF MS nos gatos com diferentes infecções clínicas, mostrando-se método prático, de resultado acurado, rápido e de custo acessível, no diagnóstico da pasteurelose em felinos domésticos;
- ✓ Antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos, tetraciclina e fluorquinolonas foram efetivos *in vitro*, podendo ser considerados como alternativas de fármacos no tratamento da pasteurelose felina em diferentes apresentações clínicas;
- ✓ Isolados de *Pasteurella* foram resistentes a fármacos do grupo dos aminoglicosídeos (amicacina) e macrolídeos (azitromicina), ressaltando a importância da instituição do tratamento da pasteurelose felina com base em testes *in vitro* de sensibilidade microbiana do patógeno.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária FMVZ – UNESP, Botucatu - SP - Código de Financiamento 001.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAMIAN, F.M., GOLDSTEIN, E.J.C. Microbiology of Animal Bite Wound Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 231-246, 2011.

ALMEIDA, B.O. Etiologia polimicrobiana na otite externa canina identificada pela espectrometria de massas e multirresistência bacteriana aos antimicrobianos. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2023. 48p.

AWOSILE, B.B.; MCCLURE, J.T.; SAAB, M.E.; HEIDER L.C.; Antimicrobial resistance in bacteria isolated from cats and dogs from the Atlantic Provinces, Canada from 1994-2013. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 8, p. 885, 2018.

BARREIRO, J.R.; FERREIRA, C.R.; SANVIDO, G.B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BOTTCHE, V.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 5661-7, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI (2020a). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals** (CLSI VET 015). 5th edition. Wayne, PA. 2020. 250p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI (2020b). **Performance standards of Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th Edition. Wayne, PA. 332p.

DOLIESLAGER, S. M., RIGGIO, M. P., LENNON, A., LAPPIN, D. F., JOHNSTON, N., TAYLOR, D., & BENNETT, D. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 93-98, 2011.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Rev.** v.26, p.58–85, 2013.

FERREIRA, T. S. P. Isolamento e caracterização de *Pasteurella multocida* provenientes de animais de companhia. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FERREIRA, T. S. P., MORENO, L. Z., FELIZARDO, M. R., DE GOBBI, D. D. S., FILSNER, P. H. D. L. N., DE MOURA GOMES, V. T., MORENO, A. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cats, dogs and rabbits from Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 48-52. 2016

FOSTER, S.F.; MARTIN, P.; ALLAN, G. S.; BARRS, V.R.; MALIK, R. Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995–2000). **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 6, n. 3, p. 167-180, 2004.

FRESHWATER, A. Why your housecat's trite little bite could cause you quite a fright: a study of domestic felines on the occurrence and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida*. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n 8-10, p. 507-513, 2008.

GUIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F.; DOWLING, P.M. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5^a ed. Iowa, USA: Wiley & Sons Inc, Blackwell. 2013, 704p.

GIORDANO, A.; DINCMAN, T.; CLYBURN, B.E.; STEED, L.L.; ROCKEY, D.C. Clinical features and outcomes of *Pasteurella multocida* infection. **Medicine**, v. 94, n 36, 2015.

GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.C.; FERREIRA, C.R.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; SANTOS, M.V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v.173, p.147-151, 2014.

GREENE, C.E & GOLDSTAIN E. J. C. Infecções de Ferimentos por Mordedura. In: GREENE, C.E. **Doenças Infecciosas em cães e gatos**. 4 ed. Roca, Rio de Janeiro, 2012 p. 557-571.

GYLES, C. L., PRESCOTT, J. F., SONGER, J. G., & THOEN, C. O. *Pasteurella*. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. John Wiley & Sons, Iowa, 2010, ed. 4, p. 325-340

HAGAN, W. A., BRUNER, D. W., GILLESPIE, J. H., TIMONEY, J. F., SCOTT, F. W., & BARLOUGH, J. E. The Genus *Pasteurella*. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. Cornell University Press, Ithaca e Londres, 1988, ed. 8, p. 104-115.

HARASEN, G. L. & LITTLE, S. E. Doenças musculoesqueléticas. In: LITTLE, S. E. **O Gato: Medicina interna**. 1 ed. Roca, Rio de Janeiro, 2015. p. 678-706.

HOLST, E., ROLLOF, J., LARSSON, L., NIELSEN J. P. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. **Journal Clinical Microbiology**. v. 30, p.2984–2987, 1992.

INSTITUTO PET BRASIL (IPB) Disponível em: <institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393 milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil>, 2022. Acesso em 06/11/2022.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRIZ, M.R.; OLSON, P. Canine and feline theriogenology. **Sanders**, 2001. 592p.

JUNQUEIRA, A. N. N. Características da população de cães e gatos domiciliados do Brasil. 27p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília, 2017.

KHEIRAN, A., PALIAL, V., ROLLETT, R., WILDIN, C. J., CHATTERJI, U. & SINGH, H. P. Cat bite: an injury not to underestimate. **Journal of plastic surgery and hand surgery**, v. 53, n. 6, p. 341-346, 2019.

KUBATZKY, K. F. *Pasteurella multocida* and immune cells. In: **Pasteurella multocida**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 53-72.

KUHNERT, P.; BISGAARD, M.; KORCZAK, B.M.; SCHWENDENER, S.; CHRISTENSEN, H.; FREY, J. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n.1, p.1-7, 2012.

LLORET, A., EGBERINK, H., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONNES, T., HARTMANN, K., HOSIE, M. J., LUTZ, H., MARSILIO, F., MOSTL, K., PENNISI, M. G., RADFORD, A.D., THIRY, E., TRUYEN, U., & HORZINEK, M.C. *Pasteurella multocida* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 7, p. 570-572, 2013.

LIU, W., CHEMALY, R.F., TUOHY M.J., LASALVIA M. M., & PROCOP G.W. *Pasteurella multocida* urinary tract infection with molecular evidence of zoonotic transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 58-60, 2003.

LOVE, D. N.; MALIK, R.; JACQUELINE, M.N. Bacteriological warfare amongst cats: What have we learned about cat bite infection? **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 2179 - 2193, 2000

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.T.; GISKE, C.T.; ... MONNET, D.T. Multidrug-resistant, extensively

drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n.3, p. 268-281, 2012.

MIRZAI, S., RIFAI, A.O., TIDRICK, A., HUANG, Q., HALE, J (2019). A case report on *Pasteurella multocida* peritoneal dialysis-associated peritonitis: When cats think medical equipment are toys. **Case Reports in Nephrology**, e5150691.

MORENO, L.Z.; MATAJIRA, C.E.C.; POOR, A.P.; MESQUITA, R.E.; GOMES, V.T.M.; SILVA, A.P.S.; AMIGO, C.R.; CHRIST, A.P.G.; BARBOSA, M.R.F.; SATO, M.I.Z.; MORENO, A.M. Identification through MALDI-TOF mass spectrometry and antimicrobial susceptibility profiling of bacterial pathogens isolated from sow urinary tract infection. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2018.

MOUTINHO, F.F.B; SERRA, C.M.B; VALENTE, L.C.M. situação pós-adoção dos animais adotados junto a uma ONG de proteção animal no estado do Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1-14, 2019.

MU, H.; YANG, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J.; YUAN, W.; RONG, S (2020). Pet-related *Pasteurella multocida* induced peritonitis dialysis: a case report and review of the literatures. **BMC Nephrology**, 21, e102.

MUTTERS, R.; IHM, P.; PHOL, S.; FREDERICKSEN, W.; MANNHEIM, W. Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 309-322, 1985.

NAKANISHI, H., FURUYA, M., SOMA, T., HAYASHIUCHI, Y., YOSHIUCHI, R., MATSUBAYASHI, M. & SASAI, K. Prevalence of microorganisms associated with feline gingivostomatitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, n. 2, p. 103-108, 2019.

NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K.A.; KLAAS, I.C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.3, p.2515-2524, 2019.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100–111, 2015.

PASCUAL-GARRIGOS, A.; MARUTHAMUTHU, M.K; AULT, A. DAVIDSON, J. L.; RUDAKOV, G.; PILLAI, D.; JOHNSON, T.; VERMA, M. S. On-farm

colorimetric detection of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* in crude bovine nasal samples. **Veterinary research**, v. 52, n.1, p. 1-12. 2021

PENG, Z., WANG, X., ZHOU, R., CHEN, H., WILSON, B. A., & WU, B. *Pasteurella multocida*: genotypes and genomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 4, p. 14-19, 2019.

PORTILHO, F.V.R. Resistência “*in vitro*” aos antimicrobianos e microbiota bucal de cães diagnosticada por microbioma e espectrometria de massas. 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

QUIMBY, J. & LAPPIN, M. R. Medicina Respiratória e Torácica. *In*: LITTLE, S. E. **O Gato: Medicina interna**. 1 ed. Roca, Rio de Janeiro, 2015. p. 814-826

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; LEONARD, F.C; FITZPATRICK, E.S; FANNING, S. & HARTING, P.J. *Pasteurella* species, *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi*. *In*: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 2011, p. 300-308.

REIS, C. A. C. Caracterização genética e perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *Pasteurella multocida* oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2019

RIBEIRO, M. G., DE MORAIS, A., ALVES, A. C., BOLAÑOS, C., DE PAULA, C. L., PORTILHO, F., DE NARDI JÚNIOR, G., LARA, G., DE SOUZA ARAÚJO MARTINS, L., MORAES, L. S., RISSETI, R. M., GUERRA, S. T., BELLO, T. S., SIQUEIRA, A. K., BERTOLINI, A. B., RODRIGUES, C. A., PASCHOAL, N. R., DE ALMEIDA, B. O., LISTONI, F., SÁNCHEZ, L., PAES, A. C. *Klebsiella*-induced infections in domestic species: a case-series study in 697 animals (1997–2019). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 455–464, 2022.

ROCHA, B. Z. L.L.; PORTILHO, F. V. R.; GARINO JÚNIOR F.; MONTI, F. S.; DE ALMEIDA, B. O.; DE SOUZA, A. A. L.; MORIZANE, Y.; SAKAIZAWA N.; SUZUKI, Y.; KAKUDA, T.; TAKAI, S.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO, M. G. Cellulitis-related *Rhodococcus equi* in a cat harboring VAPA-type plasmid pattern. **Microbial Pathogenesis**, v.160, e:105186, 2022.

SALERNO, T.; PAES, A.C. Enfermidades pelos gêneros *Pasteurella* e *Mannheimia*. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G, PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. Roca, Rio de Janeiro, 2016, p. 212-222.

SHIRZAD-ASKI, H., & TABATABAEI, M. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates obtained from poultry, ruminant, cats and dogs using RAPD and REP-PCR analysis. **Molecular biology research communications**, v. 5, n. 3, p. 123–132. 2016.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P.K.; VIRDI, J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1-16, 2015.

SOUZA, M. J. & NEW JR, J. C. Doenças Felinas Zoonóticas e prevenção da transmissão. *In*: LITTLE, S. E. **O Gato: Medicina interna**. 1 ed. Roca, Rio de Janeiro, 2015. p. 1047-1052.

TALAN, D. A., CITRON, D. M., ABRAHAMIAN, F. M., MORAN, G.J., & GOLDSTEIN, E. J. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 85-92, 1999.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALISSON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2017, p. 688.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística**. 9.ed, Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 682.

UJVÁRI, B.; WEICZNER, R.; DEIM, Z.; TERHES, G.; URBÁN, E.; TÓTH; A. R.; MAGYAR, T. Characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from human infections. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 63, p. 37-43, 2019.

UJVÁRI, B.; GANTELET, H.; MAGYAR, T. Development of a multiplex PCR assay for the detection of key genes associated with *Pasteurella multocida* subspecies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 34, n. 2, p. 319-322. 2022

VERONEZI, T. M. Estudo retrospectivo da prevalência de infecção bacteriana do trato respiratório superior através da análise da cultura bacteriológica e antimicrobiana em felinos domésticos. 2017.

WALKER, A.L.; JANG, S.S.; HIRSH, D.C.; Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 95 cases (1989-1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 3, p. 359-363, 2000.

WANG A. L.; LEDBETTER, E.C.; KERN, T.J. Orbital abscesso bacterial isolates and *in vitro* antimicrobial susceptibility patterns in dogs and cats. **Veterinary ophthalmology**, v. 12, n. 2, p. 91-96, 2009.

WANG, J.; SANG, L.; SUN, S.; CHEN, Y.; CHEN, D.; XIE, X. Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from dead rabbits with respiratory disease in Fujian, China. **BMC veterinary research**, v.15, n.1, p. 1-6. 2019

WEI, A.; DHADUK, N.; TAHA, B. Wrist abscess due to drug-resistant *Pasteurella multocida*. **IDCases**, v. 26, p. 1277, 2021.

WESTLING, K.; FARRA, A.; CARS, B.; EKBLÖM, A.G.; SANDSTEDT, K.; SETTERGREN, B.; WRETLIND, B.; JORUP, C. Cat bite wound infections: a prospective clinical and microbiological study at three emergency wards in Stockholm, Sweden. **The Journal of Infection**. v. 53, n.6, p. 403-407, 2006.

WILSON, B. A. & HO, M. *Pasteurella multocida*: From Zoonosis to cellular microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.3, p. 631-655, 1 jul. 2013.

ZANGENAH, S.; GÜLERYÜZ, G.; BORÄNG, S.; ULLBERG, M.; BERGMAN, P.; ÖZENCI, V. Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF — a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 2, p.96-98, 2013.

Anexo 1: Certificado de aprovação da Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP Botucatu, SP



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Perfil de sensibilidade microbiana "in vitro" e identificação de espécies por espectrometria de massas em isolados de *Pasteurella* obtidos de diferentes afecções em gatos." **Protocolo CEUA 0224/2021**, a ser conduzido por Carolina Aparecida Rodrigues, responsável/orientador Márcio Garcia Ribeiro, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/06/2022 a 31/12/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	HV da UNESP ou clínicas particulares

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 17/11/2021

JOSÉ NICLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

ANIMAL	RAÇA	IDADE	SEXO	Ht (%)	Leucócitos (10 ³ /μL)	MALDI- TOF MS	AFEÇÃO	FIV/FelV	ACESSO A RUA	ÉPOCA DO ANO	DESFCHO
1	SRD	Desc.	F	36	6,5	<i>Pasteurella multocida</i>	Ferida	NR	SIM	MARÇO	Eutanásia
2	SRD	16a	M	21	83,3	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	SIM	JULHO	Eutanásia
3	SRD	3a	M	32	22,5	<i>Pasteurella multocida</i>	Infecção urinária	NR	SIM	JULHO	Óbito
4	SRD	1a	M	NR	NR	<i>Pasteurella dagmatis</i>	Conjuntivite	NR	NÃO	AGOSTO	Desc.
5	SRD	3a	M	33	5,9	<i>Pasteurella multocida</i>	Infecção urinária	NR	SIM	AGOSTO	Desc.
6	SRD	Desc.	F	27	10	<i>Pasteurella multocida</i>	Neoplasia	NR	NÃO	SETEMBRO	Desc.
7	SRD	14a	M	35	7,9	<i>Pasteurella multocida</i>	Pneumonia	NR	SIM	SETEMBRO	Óbito
8	SRD	10a	M	25	32,8	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	SIM	OUTUBRO	Óbito
9	SRD	2a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Ferida	FelV (+)	SIM	NOVEMBRO	Desc.
10	SRD	1a	M	43	17,8	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	NÃO	DEZEMBRO	Alta
11	SRD	1a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	Desc.	DEZEMBRO	Desc.
12	SRD	11a	F	NR	NR	<i>Pasteurella canis</i>	Conjuntivite	NR	SIM	DEZEMBRO	Alta

13	SRD	2m	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	NÃO	DEZEMBRO	Alta
14	SRD	1a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Pneumonia	Negativos	SIM	JANEIRO	Alta
15	SRD	6a	M	26	9,2	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	SIM	FEVEREIRO	Alta
16	SRD	16a	M	43	11,4	<i>Pasteurella multocida</i>	Pneumonia	FeLV (+)	NÃO	FEVEREIRO	Óbito
17	Maine-coon	1a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Efusão pleural	Negativos	Desc.	MARÇO	Óbito
18	SRD	14a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	NR	SIM	MAIO	Alta
19	SRD	Desc.	F	22	3,7	<i>Pasteurella multocida</i>	Piometra	NR	SIM	SETEMBRO	Alta
20	SRD	10a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Conjuntivite	NR	Desc.	DEZEMBRO	Desc.
21	SRD	10a	F	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso	NR	SIM	MARÇO	Eutanásia
22	SRD	4m	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Pneumonia	NR	NÃO	MARÇO	Desc.
23	SRD	7a	F	40	8,1	<i>Pasteurella multocida</i>	Efusão pleural	NR	NÃO	MAIO	Óbito
24	SRD	12a	F	NR	NR	<i>Pasteurella dagmatis</i>	Abscesso cutâneo	NR	NÃO	JUNHO	Alta
25	SRD	9a	M	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Ferida	NR	Desc.	AGOSTO	Alta
26	Exótico pelo curto	11a	F	NR	NR	<i>Pasteurella multocida</i>	Abscesso cutâneo	Negativos	SIM	AGOSTO	Alta