

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO TÉCNICO-CIENTÍFICO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Genotipificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de métodos moleculares

Autora: Cintia Simoni

Porto Alegre

2013/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO TÉCNICO-CIENTÍFICO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Genotipificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de métodos moleculares

Autora: Cintia Simoni

Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
Graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Sérgio Ceroni da Silva
Co-orientadora: Luiza Amaral de Castro

Porto Alegre

2013/1

RESUMO

O *Actinobacillus pleuropneumoniae* é o agente da pleuropneumonia suína, doença infecto-contagiosa amplamente distribuída no rebanho suíno mundial e de importância econômica significativa, podendo afetar suínos susceptíveis de várias idades. O agente possui 15 sorotipos conhecidos, os quais podem apresentar reações cruzadas em testes diagnósticos, dificultando a sorotipificação. A determinação do sorotipo de ocorrência em um dado surto e/ou região é importante na promoção da profilaxia, mas não é a única exigência para um efetivo controle. Em razão da diversidade genética e das diferenças na virulência entre as amostras, mesmo em amostras de um mesmo sorotipo, é necessário o desenvolvimento de métodos que possam diferenciar as amostras isoladas a campo em diferentes surtos da doença. O objetivo deste trabalho é o de desenvolver e padronizar técnicas de biologia molecular, visando a genotipificação de isolados de *A. pleuropneumoniae*. A primeira técnica a ser padronizada foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), na qual foram utilizados os *primers* OPG-10 e OPG-19 (Operon Technologies). Entretanto, as tentativas iniciais de padronização da técnica evidenciaram que a mesma possui uma baixa reprodutibilidade. Em vários experimentos, amostras em duplicata divergiam quanto ao padrão de *amplicons* obtidos. A segunda foi a ERIC-PCR – técnica molecular baseada na amplificação por PCR de sequências de consenso presentes em elementos palindrômicos repetitivos (ERIC – *Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus*). O método ERIC apresentou reprodutibilidade entre amostras em duplicata e distinção efetiva dos diferentes sorotipos e amostras de campo. O padrão de *amplicons* gerado pela técnica também permitiu minuciosa análise filogenética das amostras isoladas de campo, na qual todas as amostras testadas puderam ser identificadas e caracterizadas individualmente, podendo ser agrupadas em subpopulações filogeneticamente relacionadas. A partir dos resultados obtidos é possível realizar estudos epidemiológicos mais detalhados do agente no nosso meio. A pesquisa alcançou seus objetivos na diferenciação dos isolados, porém, outros métodos devem ser pesquisados e padronizados para auxiliar a sorotipificação e a genotipificação do agente. Entre eles podemos citar a identificação dos genes que codificam para as toxinas Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae RTX toxins*) e as técnicas RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e AFLP (*amplified fragment length polymorphism*).

ABSTRACT

The *Actinobacillus pleuropneumoniae* is the agent of porcine pleuropneumonia, contagious infectious disease widely distributed in the world and of significant economic importance, affecting susceptible pigs of various ages. The agent has 15 known serotypes, which may cross-react in diagnostic tests, making it difficult to serotyping. Determining the serotype of occurrence in a given outbreak and / or region is important in promoting prevention, but it is not the only requirement for effective control. Due to the genetic diversity and differences in virulence between samples, even in samples of the same serotype, it is necessary to develop methods that can differentiate isolates the field in different outbreaks. The objective of this work is to develop and standardize techniques of molecular biology, aiming genotyping of isolates of *A. pleuropneumoniae*. The first technique to be standardized was RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), in which the primers used were OPG-10 e OPG-19 (Operon Technologies). However, initial attempts to standardize the technique showed that it has a low reproducibility. In several experiments, duplicate samples differed in the pattern of amplicons. The second was the ERIC-PCR - molecular technique based on PCR amplification of consensus sequences present in repetitive palindromic elements (ERIC – *Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus*). The method showed reproducibility between duplicate samples and effective distinction of different serotypes and field samples. The pattern of amplicons generated by the technique also allowed detailed phylogenetic analysis of strains isolated from field, in which all the tested samples could be identified and characterized individually and can be grouped into phylogenetically related subpopulations. From the results obtained it is possible to perform more detailed epidemiological studies of the agent in our midst. The study achieved its objectives in the differentiation of isolates, however, other methods must be researched and standardized to help serotyping and genotyping the agent. Among them we can cite the identification of the genes encoding the toxins Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins) and the techniques RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) and AFLP (*amplified fragment length polymorphism*).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro (s)
°C	Graus Celsius
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AM	Macrófagos alveolares
Apx	Antinobacillus pleuropneumoniae RTX toxins
CAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CO ₂	Gás carbônico
CRDS	Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus
IgG	Imunoglobulina G
LPS	Lipopolissacarídeos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIC	Concentrações Inibitórias Mínimas
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	Nanômetro (s)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV2	Circovírus Suíno tipo 2
pg	Picogramas
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PPS	Pleuropneumonia suína
PRRS	Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos
RAPD	Randon Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIV	Vírus da Influenza
sp.	Espécie
TBE	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer
Tbp	Tranferrin binding protein
U	Unidade
V	Volt (s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	Pleuropneumonia suína	9
2.2	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	15
2.3	Métodos de biologia molecular	17
2.3.1	Método RAPD (<i>Randomly Amplified Polimorphic DNA</i>)	19
2.3.2	Método ERIC (<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>)	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Extração e quantificação do DNA	21
3.2	RAPD	21
3.3	ERIC	22
3.4	Eletroforese	22
3.5	Análise filogenética	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5	CONCLUSÕES	25
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
	ANEXO – FIGURAS	30

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade de grande importância no agronegócio brasileiro, principalmente nos estados do sul do país, e possui papel significativo na fixação de trabalhadores no campo e de empregos diretos e indiretos em toda a cadeia produtiva. No Brasil, a atividade é predominantemente de pequenas propriedades rurais, com 80% de criação em unidades de até 100 hectares (WILKINSON; ROCHA, 2005) e corresponde a 28,7% dos estabelecimentos rurais brasileiros (IBGE, 2006). A carne suína é a mais consumida no mundo, atingindo 37,45% do consumo total de carnes (PORKWORLD, 2011). Já no Brasil, a carne bovina representa 55% do consumo total, a carne de frango, 30%, e a suína, apenas 15%.

A cadeia produtiva de suínos vem se destacando pelos ganhos tecnológicos e pelo volume de investimentos injetados na atividade. Há também um forte dinamismo na produção, com sensíveis alterações na escala de produção (RODRIGUES *et al.*, 2009). Uma grande porção da produção brasileira de carne suína parte de um processo integrado, com disponibilidade de insumos como grãos de milho e de soja, que resulta em uma atividade com menor custo de produção e, conseqüentemente, mais competitiva no cenário externo. O custo de produção de carne suína é considerado o menor quando comparado a outros países de grande produção, como Estados Unidos e China.

A expectativa de produção de carne suína para o ano de 2013 é de 107,4 milhões de toneladas no mundo e de 3,4 milhões de toneladas no Brasil (USDA, 2013) – fazendo com que o Brasil ocupe o quarto lugar no ranking de produção. A exportação de carne suína do Brasil em 2011 foi de 582 mil toneladas (ABIPECS, 2011). Entretanto, com o fechamento do mercado ucraniano – que possui 24% de participação da exportação da carne suína brasileira – em 2013, houve uma retração de 53% nos embarques de exportação. Apenas no mês de maio de 2013 houve uma queda de 17,88% na exportação de carne suína no Rio Grande do Sul – que deixou de arrecadar pelo menos US\$ 729,6 milhões em exportações do produto devido às barreiras impostas pelo país.

Todas essas informações evidenciam a importância econômica da produção suína no mundo e no território nacional. Dentre os problemas sanitários encontrados na suinocultura brasileira, as doenças respiratórias estão entre as mais prevalentes e se apresentam de forma enzoótica. Segundo Mores e Zanella (2006) entre 1996 a 1999, de um abate nacional de 33%, as condenações devido à presença de lesões envolvendo o pulmão e a pleura foram de 0,639%. As doenças respiratórias suínas possuem diversas causas – fatores infecciosos, ambientais, sanitários e de manejo. Os principais agentes infecciosos primários são:

Mycoplasma hyopneumoniae, Vírus da doença de Aujeszky e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Outros patógenos comuns, como pasteurelas e estreptococos, se apresentam em forma de infecções secundárias.

Muitos estudos apontam interação entre as causas e entre os agentes infecciosos, que pode potencializar os efeitos e a gravidade das doenças respiratórias. Segundo Alberton e Rocha (2010), esta sinergia entre agentes infecciosos nos quadros de pneumonia tem sido denominada como o Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CRDS), onde os principais agentes infecciosos primários são: Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2), Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (PRRS), Vírus da Influenza (SIV), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*. Os agentes das doenças respiratórias mais comuns na suinocultura variam de região para região, assim como suas importâncias econômicas e sanitárias.

A pleuropneumonia suína, causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, é importante em diversas criações brasileiras – especialmente em granjas terminadoras que não realizam vazão sanitário ou em granjas de ciclo completo. A doença está associada com a produção intensiva e é relacionada com fatores ambientais e de manejo (COELHO *et al.*, 2004). Segundo Mores e Zanella (2006), um estudo soro-epidemiológico em granjas de suínos localizadas em alguns Estados brasileiros, cujas amostras de soro foram colhidas entre 1966 a 1999, indicou uma prevalência de anticorpos para o *A. pleuropneumoniae* de 48,27%. O estudo também sugere que tanto a doença de Glässer, cujo agente é o *Haemophilus parasuis*, como a pleuropneumonia suína são mais importantes em rebanhos melhorados, grandes e com bom “status” sanitário.

O diagnóstico da pleuropneumonia suína deve ser realizado através da identificação do agente, por isolamento, PCR ou imunohistoquímicas, associado às evidências clínicas. Entretanto, o entendimento epidemiológico dos surtos, assim como a pesquisa da rastreabilidade das cepas identificadas e isoladas, se torna uma importante ferramenta no controle do agente e deve ser empregada também na profilaxia e na prevenção de futuros surtos. Para tanto, há necessidade de pesquisas e desenvolvimentos de métodos que possam auxiliar neste processo.

Diversas técnicas de biologia molecular foram propostas para a genotipificação do *A. pleuropneumoniae* e para outros agentes patogênicos. Entre elas podemos citar a identificação dos genes que codificam para as toxinas Apx (*A. pleuropneumoniae* toxins), que pode auxiliar também na sorotipificação das cepas e tem como vantagem não necessitar de colônias puras,

diferentemente das técnicas de genotipificação e de *fingerprinting*. Outras técnicas, como RFLP e AFLP, já foram desenvolvidas e padronizadas em pesquisas que visavam a identificação e diferenciação de agentes patogênicos.

No artigo de Puente-Redondo *et al.* (2000), a técnica RFLP foi padronizada para identificação de cepas de *A. pleuropneumoniae* através da análise dos fragmentos de polimorfismo de comprimento. No mesmo artigo, foi realizado PCR nos genes *tbpA* e *tbpB* (genes que codificam as proteínas de ligação da transferrina TbpA e TbpB), que são altamente conservados e que tem correlação com os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. Kokotovic e Angen (2007) desenvolveram uma pesquisa com a técnica AFLP para elucidar a relação genotípica de *A. pleuropneumoniae* e *Actinobacillus lignieresii* (agente da actinobacilose de bovinos conhecida como “Língua de Pau”) e para investigar a diversidade intra-espécie de *A. pleuropneumoniae*.

Ambas as pesquisas tiveram sucesso na padronização das técnicas e na diferenciação genotípica das cepas de *A. pleuropneumoniae*. Entretanto, também acordam quanto a confiabilidade dos protocolos desenvolvidos para a genotipificação do agente. Ambos os protocolos correlacionam os seus resultados com os sorotipos e objetivam utilizá-los na caracterização genotípica de amostras não sorotificáveis.

Demonstrada a importância da pleuropneumonia suína e da pesquisa por métodos moleculares que objetivam a identificação, caracterização e diferenciação de amostras sorotificáveis e não sorotificáveis de *A. pleuropneumoniae*, este trabalho visa o desenvolvimento de métodos moleculares que possam superar as dificuldades encontradas nos atuais métodos de diagnóstico e de análise epidemiológica do agente da pleuropneumonia suína.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A pleuropneumonia suína é uma doença multifatorial e de importância econômica significativa para a suinocultura. Esta doença pode afetar suínos susceptíveis de várias idades e ocorre principalmente em regiões precárias de criação de suínos em todo o mundo (QUINN *et al.*, 2005). É causada pelo agente *Actinobacillus pleuropneumoniae*, um cocobacilo gram-negativo pertencente à família *Pasteurellaceae*, mesma da *Pasteurella* spp. e do *Haemophilus parasuis* (agente da Doença de Glässer). Os actinobacilos são, em sua maioria, comensais de membranas mucosas de várias espécies animais, principalmente no trato respiratório superior e na cavidade oral. Outros exemplos do gênero são o *A. lignieressi*, agente da actinobacilose em bovinos, mais conhecida como “língua de pau”, e o *A. equuli*, agente da doença do potro sonolento. Já o *A. suis* causa septicemia com alta mortalidade em leitões e pode atingir outras espécies animais, inclusive o homem - causando septicemia e meningite.

2.1 Pleuropneumonia Suína (PPS)

A pleuropneumonia suína, causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, é uma doença infecto-contagiosa multifatorial que causa lesões graves no pulmão e na pleura (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007; HAESEBROUCK *et al.*, 1997). Os primeiros surtos foram observados na Argentina, em 1961, por SHOPE (1963), e nos Estados Unidos da América, por OLANDER (1963). Entretanto, Pattison, Howell e Elliott (1957) relatou um surto no qual a pleuropneumonia suína era a provável causa. No Brasil, a PPS foi diagnosticada pela primeira vez em 1981 (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). A partir de então, vários surtos foram diagnosticados nas regiões onde a suinocultura intensiva é praticada. As perdas econômicas causadas pela doença ocorrem pela alta mortalidade (forma aguda), redução da produção, aumento do índice de conversão e custos associados à terapêutica e profilaxia (COELHO *et al.*, 2004). Há também grandes perdas de valor e condenação de carcaças no abate – devido à pleurite. Numa avaliação econômica de uma unidade acometida de surto agudo, os gastos com medicamentos e mortes de animais foram 35% superiores à média registrada antes do surto (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

A doença acomete, principalmente, propriedades onde a suinocultura é intensiva e confinada. O agente pode estar presente nos animais sem causar sintomatologia, sendo normalmente carregado por portadores assintomáticos ou portadores da forma crônica, no qual o *A. pleuropneumoniae* se localiza em nódulos pulmonares, abscessos e/ou nas tonsilas. O agente não sobrevive por muito tempo no meio ambiente e é facilmente eliminado pelos desinfetantes normalmente utilizados, portanto, os portadores são a principal fonte de infecção

(QUINN *et al.*, 2005). Já a introdução da infecção no rebanho ocorre pela introdução de animais portadores. A transmissão ocorre via aerógena e através do contato direto entre suínos. A transmissão não parece ocorrer quando em distâncias acima de quatro metros ou quando, entre duas baias, existir uma sem animais (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). O contágio através de fômites é raro.

Acredita-se que o agente, depois de inalado, entra diretamente nos alvéolos pulmonares através da traquéia e dos brônquios. Vários fatores de patogenicidade permitem a entrada e a instalação do agente nas células do trato respiratório superior e inferior dos suínos. Entre as principais, encontram-se: presença de cápsula e produção de adesinas e de exotoxinas. A produção e a secreção de proteases também são importantes na proteção do agente contra o sistema imunológico pulmonar suíno. Uma resposta inflamatória intensa ocorre logo após a instalação do agente no tecido pulmonar suíno. Esta resposta inflamatória está relacionada com os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular, secreção de urease e morte de macrófagos alveolares pelas citolisinas produzidas pelo agente. As lesões induzidas pelo LPS do *A. pleuropneumoniae* são não hemorrágicas e não necróticas, indicando que o LPS não é o responsável pelas lesões típicas da pleuropneumonia suína. Entretanto, contribui fortemente para o desenvolvimento das lesões, aumenta os efeitos das toxinas Apx (*A. pleuropneumoniae toxins*) no processo de fagocitose e tem sido atribuído na adesão do agente no muco traqueal e nas células traqueais e pulmonares (HAESEBROUCK *et al.*, 1997).

A presença de cápsula permite ao agente proteção contra a fagocitose e contra a deposição de complexos do sistema complemento na membrana externa do *A. pleuropneumoniae* (HIRSH; MacLACHLAN; WALKER, 2004). Outra característica na patogenicidade do agente é o mecanismo de aquisição de ferro através de proteínas receptoras na superfície celular. Esses receptores são expressos em condições limitadas da presença de ferro. O ferro é essencial para o crescimento e multiplicação bacteriana e não é disponível nos espaços extracelulares devido aos complexos com as glicoproteínas do hospedeiro. O processo de aquisição de ferro envolve duas proteínas: Tbp1 (*transferrin binding protein 1*) e Tbp2. As Tbp1 são as proteínas transmembranas que servem como canal para o transporte do ferro através da membrana, enquanto as Tbp2 são lipoproteínas ancoradas no terminal N da membrana. As proteínas Tbp são específicas para as transferrinas suínas, fortalecendo a idéia de que o *A. pleuropneumoniae* é espécie-específico (HAESEBROUCK *et al.*, 1997). O *A. pleuropneumoniae* também produz proteases IgG, as quais impedem a opsonização e consequente morte celular.

O fator de maior patogenicidade do agente é a produção de toxinas Apx. Estas citolisinas são tóxicas para neutrófilos e macrófagos e provocam morte celular, intensificando a resposta inflamatória. Em um experimento de van Leengoed (1989), foi demonstrado que apenas bactérias viáveis produzem substâncias citotóxicas para macrófagos alveolares, enquanto que a presença de bactérias mortas pelo calor não era citotóxica para essas células. Também foi demonstrado que mesmo os macrófagos que não continham o *A. pleuropneumoniae* nos seus fagócitos eram mortos pelas citotoxinas, provando que os efeitos tóxicos nos macrófagos não estão relacionados com a fagocitose do agente.

Em outro estudo, de Crujisen *et al.* (1992), foi demonstrado que tanto os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) quanto os macrófagos alveolares (AM) são efetivos na fagocitose do *A. pleuropneumoniae*. Entretanto, apenas os PMN são efetivos na morte intracelular do agente, enquanto os AM não são capazes de destruir o agente e são mais susceptíveis à ação das citolisinas produzidas pelo *A. pleuropneumoniae* e, conseqüentemente, à morte. A incapacidade dos AM de destruir o agente pode ser explicada por dois fatores: o metabolismo deficiente de oxigênio dos AM e a produção de citolisinas pelo *A. pleuropneumoniae*, as quais afetam os mecanismos de morte celular. Já os PMN produzem duas vezes mais superóxido e liberam cinco vezes mais peróxido de hidrogênio, quando comparados aos AM.

Este experimento também possibilitou novas teorias quanto à patogenicidade do *A. pleuropneumoniae*. A hipótese formada é de que as bactérias que escapam da primeira linha de defesa do sistema respiratório e chegam ao espaço alveolar são fagocitadas pelos AM e penetram através destes no tecido pulmonar, através da migração pelo epitélio alveolar ou pela entrada em agregados linfoides. Já a capacidade de destruição intracelular do agente pelos PMN é a razão pela qual o agente não consegue passar dos linfonodos bronquiais. Isto sugere que os PMN são os responsáveis por evitar septicemias.

Variáveis ambientais e de manejo atuam como fatores predisponentes e influenciam na severidade da doença, assim como infecções concomitantes - como circovirose (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007; HAESBROUCK *et al.*, 1997). O comprometimento do sistema imunológico suíno pode ser causado por infecções virais, traumas e fatores estressantes, e tem papel importante na patogenia da doença. Muitas vezes é difícil determinar a natureza do evento que antecedeu o surgimento da doença. Aglomeração e ventilação pobre também favorecem a propagação do agente. A alta prevalência de pleuropneumonia suína nos meses frios está mais relacionada com a gestão do manejo nesse período do que com o fator climático em si (HIRSH; MacLACHLAN; WALKER, 2004).

Ventilação precária somada a quedas repentinas na temperatura ambiental parecem precipitar surtos da doença. Os surtos ocorrem em granjas susceptíveis e a doença manifesta-se por animais encontrados mortos e por animais com intensa dispneia, piroxia, anorexia e indisposição. Nestes casos, a mortalidade pode atingir 50% (QUINN *et al.*, 2005) a 100% (COELHO *et al.*, 2004.). A morbidade torna-se elevada em novos surtos da doença.

A pleuropneumonia suína ocorre sob as seguintes formas clínicas:

1) forma superaguda: animais são encontrados mortos e muitas vezes há presença de sangue nas narinas e na boca;

2) forma aguda: observa-se anorexia, prostração e hipertermia (40,5-42°C). Os animais afetados permanecem afastados dos demais, com tosse profunda e em posição de “cão sentado” ou em decúbito esternal, evidenciando intensa dificuldade respiratória (Figura 1). A falta de oxigenação causada pela intensa inflamação pulmonar pode ocasionar cianose, que pode ser visualizada pela vermelhidão aparente na pele destes animais. Porcas prenhes podem abortar. O sinal que antecede a morte é a presença de fluxo sanguinolento nasobucal;

3) forma crônica: pode ocorrer em animais que sobreviveram à forma aguda, animais assintomáticos e portadores. Os únicos sinais evidenciados são a falta de desenvolvimento, ou desenvolvimento retardado, e acessos esporádicos de tosse. Um importante ponto que deve ser investigado é o aumento de condenações de abate nos frigoríficos devido à aderência de pleura e pericárdio (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007; QUINN *et al.*, 2005).

A pleuropneumonia suína caracteriza-se por broncopneumonia necrosante e hemorrágica e pleurite fibrinosa. As lesões são, na sua maioria, exclusivas da cavidade torácica. Os lobos mais acometidos são o diafragmático e o cardíaco direitos e a pleura adjacente às lesões pulmonares é invariavelmente afetada – achado típico da pleuropneumonia suína. Nos animais afetados pelas formas superaguda e aguda, encontram-se áreas de consolidação pulmonar, com focos de hemorragia e necrose, recobertas por espessa camada de fibrina – lesões fibrinohemorrágicas, além de exsudação sorofibrinosa a fibrinosanguinolenta nas cavidades pleural e pericárdica, podendo estender-se à traqueia (Figura 2) (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007; DAL BEM, 2008).

Nos suínos portadores da forma crônica, observa-se a presença de nódulos pulmonares encapsulados no parênquima pulmonar, abscessos pulmonares, pleurite e pericardite fibrinosa, com aderências (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007; DAL BEM, 2008). As lesões

podem ser intensificadas pela infecção concomitante de *Mycoplasma hyopneumoniae* ou *Pasteurella multocida* e fortemente agravadas na presença de doença de Aujeszky e Influenza.

No exame histopatológico, evidencia-se pleuropneumonia exsudativa fibrinohemorrágica, com predomínio de células mononucleares, e trombose de vasos sanguíneos e linfáticos – causa de grandes áreas de necrose coagulativa e edema pulmonar. Nos casos crônicos, as zonas de necrose são delineadas por uma zona de reação por neutrófilos necróticos e por tecido fibrinoso. Os septos interlobulares também se apresentam dilatados por exsudato fibrinopurulento (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007; DAL BEM, 2008).

A sintomatologia clínica, as alterações *post mortem* e os achados anatomohistopatológicos auxiliam de forma significativa para o diagnóstico presuntivo. Entretanto, o diagnóstico definitivo deve ser realizado através da identificação do agente, que pode ser por: isolamento bacteriano, técnicas de imunoperoxidase, técnicas de imunofluorescência ou PCR. A sorologia pode ser utilizada para identificar infecções crônicas ou subclínicas, perfis sorológicos em granjas infectadas, programas de vacinação ou de tratamento e controle na erradicação da doença (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). A sorotipificação do isolado é essencial no ponto de vista epidemiológico e para programas de controle e erradicação. Assim, após isolamento bacteriológico, a sorotipificação é recomendada para confirmar rapidamente o diagnóstico bacteriológico, para diferenciar cepas do biótipo I e cepas do biótipo II e para caracterizar sorotipicamente o isolado. Porém, é fortemente recomendado aplicar teste PCR em amostras sorotipificadas no biótipo II e para amostras sorotipificadas no biótipo I, sorotipos 3, 6 e 8 – para descartar reação cruzada com *S. suis* (STRAW *et al.*, 2006). Em casos crônicos, pode ser difícil isolar o agente das lesões em cronicidade. Assim, outros testes de diagnóstico devem ser considerados.

Quanto ao tratamento, o *A. pleuropneumoniae* apresenta sensibilidade *in vitro* para as penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas, quinolonas, lincosamidas, macrolídeos, cloranfenicol, sulfonamidas e gentamicinas (STRAW *et al.*, 2006; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). Na escolha do antibiótico a ser utilizado, é importante considerar os testes de sensibilidade e as concentrações dos mesmos nos pulmões – assim, o antibiótico de primeira escolha deve ser aquele com os menores MIC (concentrações inibitórias mínimas) e com as melhores propriedades farmacocinéticas. Para os suínos doentes, deve-se dar preferência para os tratamentos por via parenteral e, para o restante do lote, por via oral durante sete a dez dias, para prevenir o surgimento de novos casos (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). A terapia com antibióticos apenas é efetiva em animais em fase inicial da doença, quando a

mortalidade pode ser reduzida. Terapia com tiamulina (antibiótico diterpeno), usualmente utilizado contra doenças respiratórias - principalmente as causadas pelas bactérias do gênero *Mycoplasma*, também tem se mostrado efetiva na melhora do quadro clínico de suínos com pleuropneumonia.

Além do tratamento curativo, diversas práticas de manejo devem ser tomadas para eliminação do agente no ambiente. Dentre elas, podemos citar a desinfecção das baias e do ambiente, eliminação de animais cronicamente afetados, tratamento curativo em animais no início do quadro clínico e tratamento preventivo no restante dos animais. Identificar os animais cronicamente afetados e que não apresentam sintomatologia clínica é um dos grandes problemas no controle da doença. Animais carreadores podem apresentar falsos negativos, tanto no isolamento bacteriano como na sorologia. Técnicas de isolamento seletivo para *A. pleuropneumoniae*, como a técnica de separação imunomagnética (GAGNÉ *et al.*, 1998), e técnicas de PCR tem sido efetivas na identificação desses animais.

Outras práticas devem ser adotadas pela granja, como manejo “todos-dentro, todos-fora”, vazio sanitário, ventilação e carga animal adequadas, aquisição de reprodutores livres da doença e controle de outras doenças do trato respiratório suíno. Todas as estratégias de controle devem levar em conta as características epidemiológicas da doença. A prioridade é o controle das perdas econômicas, como mortalidade e perdas no desenvolvimento, e, a partir de então, considerar a eliminação ou mesmo a erradicação do agente.

As vacinas utilizadas são bacterinas sorotipo-específicas – portanto, a identificação dos sorotipos é importante para a escolha da vacina ou para produção de vacinas autógenas. No Brasil, há diversas vacinas que contemplam os principais sorotipos do *A. pleuropneumoniae* (sorotipos 1, 3, 5 e 7). Também há vacinas de sub-unidades, que contêm toxinas purificadas – ApxI, II e III e proteínas de membrana externa comuns a todos os sorotipos. Para as bacterinas, a vacinação deve ser realizada no mínimo 15 dias antes da exposição. Para as vacinas com toxinas purificadas, a vacinação deve ser realizada em leitões com 30 e 50 dias de idade (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

A fagocitose do agente pelos macrófagos alveolares e neutrófilos ocorre quando na presença de anticorpos contra antígenos de superfície. Já os anticorpos contra as toxinas Apx aumentam a eficiência da fagocitose dos neutrófilos e os protegem de morrer após a ingestão do agente. Entretanto, ocorre morte dos macrófagos alveolares mesmo na presença de anticorpos contra as toxinas Apx. Anticorpos contra LPS, cápsula e outras proteínas de membrana servem como opsoninas, facilitando a fagocitose por neutrófilos (HAESEBROUCK *et al.*, 1997).

2.2 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

O *A. pleuropneumoniae* (*Haemophilus pleuropneumoniae*) é, do ponto de vista morfológico, um cocobacilo gram-negativo, anaeróbico facultativo, pleomórfico, imóvel, não esporulado e capsulado (COELHO *et al.*, 2004). O isolamento do agente é realizado através do cultivo em Ágar-sangue ou Ágar-chocolate, contendo nicotinamida adenina dinucleósido (NAD ou fator V), incubado nas condições de 5 a 10% de CO₂ e a uma temperatura de 37°C – entre 20° a 42°C. O tamanho das colônias em 24hs é de 1-2 mm. O *A. pleuropneumoniae* não cresce em Ágar-MacConkey - diferentemente de outros actinobacilos - e é facilmente diferenciado através do seu perfil bioquímico (QUINN *et al.*, 2005; HIRSH; MacLACHLAN; WALKER, 2004; COELHO *et al.*, 2004).

Para o isolamento bacteriológico do agente, a coleta deve ser realizada em lesões típicas, sendo aconselhável o trabalho com amostras frescas. Nos casos agudos, o agente pode ser isolado a partir de secreções nasais (COELHO *et al.*, 2004). O hospedeiro natural do *A. pleuropneumoniae* é o suíno, mas ocasionalmente pode ser isolado de outras espécies animais (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

Já foram identificados 15 sorotipos patogênicos. Os sorotipos 1 ao 12 e o sorotipo 15 pertencem ao biótipo I e são NAD-dependentes, e os sorotipos 13 e 14 pertencem ao biótipo II e são NAD-independentes. O isolamento bacteriológico dos sorotipos do biótipo I pode ser realizado através de meios de cultivo que contenham NAD ou em satelitismo com cepas de *Staphylococcus* sp. - fenômeno CAMP (Figura 3). Os sorotipos do biótipo II podem ser isolados em meios de cultivos convencionais.

O controle efetivo da pleuropneumonia suína é realizado com o auxílio da sorotipificação dos isolados de campo. Entretanto, os sorotipos do *A. pleuropneumoniae* podem apresentar reações cruzadas em provas sorológicas. As reações cruzadas são associadas aos antígenos O e K dos lipopolissacarídeos, apesar das provas sorológicas basearem-se principalmente nos antígenos capsulares. Os sorotipos 1, 9 e 11, os sorotipos 3, 6 e 8 e os sorotipos 4 e 7 possuem epítomos comuns na composição de seus lipopolissacarídeos. A cadeia O do LPS dos sorotipos 7 e 4 também apresenta epítomo comum com *Actinobacillus ligneresii* (HAESEBROUCK *et al.*, 1997; DEBREUIL *et al.*, 2000). Há diversos testes sorológicos disponíveis para sorotipificação do *A. pleuropneumoniae* (MITTAL *et al.*, 1982, 1983, 1993, 1988). Atualmente, testes com reatividade de soro de coelho contra polissacarídeos da superfície e lipopolissacarídeos da cápsula são os mais utilizados (DEBREUIL *et al.*, 2000).

Sabe-se que determinados sorotipos têm maior prevalência em alguns países, estados e regiões (Tabela 1). No Brasil, os sorotipos de maior prevalência são 1, 3, 4, 5, 7 e 9, sendo que os sorotipos 3 e 5 são os sorotipos de dominância. Na América do Norte, os sorotipos 1 e 5 são mais comumente encontrados e o sorotipo 2 é o mais comum na Europa (HIRSH; MacLACHLAN; WALKER, 2004). Alguns sorotipos são mais virulentos que outros, como no caso dos sorotipos 1, 5, 9 e 11, que são sorotipos freqüentes em surtos com alto nível de mortalidade e graves lesões pulmonares. Já os sorotipos 2 e 7 possuem menor virulência, porém causam susceptibilidade do hospedeiro à outros sorotipos e, até mesmo, à outras doenças (DEBREUIL *et al.*, 2000). Em um experimento, Jacobsen, Nielsen e Nielsen (1995), comprovou que os sorotipos do biotipo I são mais virulentos que os sorotipos do biotipo II.

Tabela 1: Distribuição geográfica mundial dos sorotipos do *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Country	Prevalent serotypes	Dominant serotype(s)	References
Argentina	1, 2, 3, 5, 12	1	Vena <i>et al.</i> , 1997, 1988
Australia	1, 2, 3, 7, 12	1	Blackall <i>et al.</i> , 1988; 1998 Eaves and Blackall, 1988
Belgium	2, 3, 6, 7, 8, 9, 11	3	Hommez <i>et al.</i> , 1988, 1990
Brazil	1, 3, 4, 5, 7, 9	5, 3	Piffer <i>et al.</i> , 1997
Canada	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10,	5, 7, 1	Rosendal <i>et al.</i> , 1981b; Mittal <i>et al.</i> , 1982,
	11, 12	12	1992, 1998
Chile	1, 5	1, 5	Olivares and Morgado, 1988
Croatia	2, 7, 8, 9	2, 9	Habrun <i>et al.</i> , 1998
Czechoslovakia	1, 2, 7	2	Skollova and Gois, 1987
Denmark	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10,	2	Nielsen, 1982, 1987
	11, 12		
France	2, 3, 7, 8, 9	9	M. Kobisch, personal communication 1990
Germany	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	9, 2, 7	Schimmel and Hass, 1983; Muller <i>et al.</i> , 1986 Kielstein and Wuthe, 1998
Hungary	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10,	3, 2, 7	Fodor <i>et al.</i> , 1989; Molnar, 1990, 1992
	11, 12		
Italy	1, 2, 3, 4, 5, 7	5	Manzat <i>et al.</i> , 1987; Sidoli <i>et al.</i> , 1987
Ireland	3	3	Power <i>et al.</i> , 1983
Japan	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12	1, 2	Chan <i>et al.</i> , 1978; Kume <i>et al.</i> , 1986; Abe <i>et al.</i> , 1996; Fukuyasu <i>et al.</i> , 1996
Korea	2, 3, 5, 7	5, 2	Yeh, 1990
Mexico	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 8	Ciprian <i>et al.</i> , 1988; Diaz <i>et al.</i> , 1988; Ontiveros-Corpus <i>et al.</i> , 1995
Netherlands	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11	2, 9, 11	Kamp <i>et al.</i> , 1987
Norway	2	2	Falk <i>et al.</i> , 1991
Poland	1, 2, 5, 9	1, 9	Molenda, 1988; Tarasiuk <i>et al.</i> , 1991
Spain	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,	4, 7, 2	Ferri <i>et al.</i> , 1990; Gutierrez <i>et al.</i> , 1995
	10, 12		
Sweden	2, 3, 4	2	Gunnarsson, 1978
Switzerland	2, 3, 7, 9	2	Nicolet, 1988, 1992
Taiwan	1, 2, 3, 5	1, 5	Hung <i>et al.</i> , 1991; Chang and Chang, 1994
UK	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	2, 3, 8	Hunter <i>et al.</i> , 1983; Brandreth and Smith, 1985; McDowell and Ball, 1994
USA	1, 3, 5, 7, 8, 9	1, 5	Schultz <i>et al.</i> , 1983; Hoffman <i>et al.</i> , 1985; Rapp <i>et al.</i> , 1985; Fales <i>et al.</i> , 1989
Venezuela	1, 7, 4, 2, 3, 6	1	Pinda <i>et al.</i> , 1996

Fonte: DUBREUIL *et al.*, 2000.

O *A. pleuropneumoniae* possui diversos fatores de virulência, sendo mais importantes as adesinas, a cápsula e a produção de toxinas. As adesinas do *A. pleuropneumoniae* aderem-se a dois tipos celulares: nas células de revestimento da cavidade nasal e criptas tonsilares (animais carreadores) e nas células dos brônquios terminais e alvéolos (animais doentes). O *A. pleuropneumoniae* também possui duas estruturas com função semelhante às adesinas: fímbria tipo 4 e lipopolissacarídeo (que é responsável pela aderência do microrganismo à células do trato respiratório inferior de suínos). A presença de cápsula permite ao agente interferência na fagocitose e proteção contra deposição de complexos do sistema complemento do hospedeiro (HIRSH; MacLACHLAN; WALKER, 2004).

As toxinas produzidas pelo *A. pleuropneumoniae* são o fator de maior patogenicidade do agente. As toxinas Apx (*A. pleuropneumoniae* toxins) são citolisinas relacionadas com a família formadora de poros RTX-toxins (*repeats-in-structuralton*). Também são produzidas pelo *A. suis* e o *A. rossii*, já o *A. lignieressi* contém os genes de codificação, mas não os expressam (HIRSH; MacLACHLAN; WALKER, 2004).

As Apx são tóxicas para macrófagos alveolares e neutrófilos. A ApxI (hemolisina I ou citolisina I) é uma proteína hemolítica e citolítica. Esta citolisina possui similaridades com a α -hemolisina da *E. coli* e com a leucotoxina da *Pasteurella haemolytica*. É produzida pelos sorotipos 1, 5, 9, 10 e 11, assim como por *A. suis*. A ApxII (hemolisina II ou citolisina II) é fracamente hemolítica e citolítica. É produzida por todos os sorotipos, exceto sorotipo 10, e também é produzida por *A. suis*. A ApxIII (pleurotoxina) não é hemolítica e é fortemente citotóxica. É produzida pelos sorotipos 2, 3, 4, 6 e 8 (HAESEBROUCK *et al.*, 1997). A ApxIV é produzida por todos os sorotipos e sua função ainda não foi elucidada.

Diferenças na virulência entre os sorotipos, e mesmo em cepas de mesmo sorotipo, têm sido evidenciadas. A explicação pode estar nas diferenças entre as estruturas capsulares, composição do LPS ou dos tipos de hemolisinas.

2.3 Métodos de biologia molecular

As técnicas de biologia molecular são largamente utilizadas no diagnóstico de doenças e na identificação de mutações e anomalias do DNA. A técnica mais comumente utilizada é a PCR, que consiste na amplificação de milhares ou milhões de moléculas de DNA ou cDNA. A técnica foi desenvolvida pelo geneticista Kary Mullis em 1993 e, desde então, novas técnicas de amplificação vêm sendo pesquisadas e elaboradas.

A técnica PCR tem todo o seu processo realizado *in vitro*, gerando DNA em quantidade suficiente para análises posteriores (podendo chegar a 0,3 μ g). Também é muito

sensível, necessitando de uma quantidade mínima de amostra – proporcionando a aplicação da técnica para pesquisas básicas e também para medicina forense, controle de qualidade industrial, entre outros (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

Em geral, a reação de amplificação visa uma sequência-alvo de DNA a ser amplificada e é realizada por dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), uma DNA-polimerase termoestável (derivada da enzima homonina da bactéria *Thermus* sp. expressa em *E. coli*), desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação e concentração adequada de $MgCl_2$. O ciclo da reação de amplificação do DNA ocorre com os seguintes passos: desnaturação do DNA (em temperaturas próximas a $95^\circ C$), anelamento dos oligonucleotídeos com o DNA molde e extensão da cadeia de DNA (polimerização). As etapas são repetidas várias vezes (cerca de 20 a 30 ciclos), em um termociclador, permitindo a amplificação do DNA-molde de modo que os *amplicons* possam ser posteriormente analisados.

As condições iniciais para a amplificação, tais como concentrações de $MgCl_2$, de enzima e de *primers* e de temperatura de hibridização, devem ser definidas para cada par de oligonucleotídeos. A temperatura de hibridização a ser escolhida depende da sequência do oligonucleotídeo iniciador, sendo maior para sequências com mais conteúdo de G+C (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012). Outro fator que deve ser levado em consideração no momento da escolha da temperatura de hibridização é a especificidade e a sensibilidade da amplificação para a sequência-alvo.

As principais aplicações da PCR são: PCR em tempo real (qPCR), Nested-PCR, amplificação de regiões específicas do genoma ou de transcritos, análise de polimorfismos de DNA, entre outras.

Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes em uma população e em uma frequência maior que 1% - variantes de sequência de DNA que estão presentes em uma frequência menor que 1% são arbitrariamente chamadas de mutação (COSTA *et al.*, 2007). A análise dos polimorfismos é utilizada para mapeamento genético com marcadores, clonagem e identificação de genes causadores de doença. Quanto à utilização de marcadores moleculares, a aplicação direta é no estudo da diversidade genética de uma população.

Em razão da diversidade genética e das diferenças na virulência entre as amostras, mesmo em amostras de um mesmo sorotipo, é necessário o desenvolvimento de métodos que possam genotipificar as amostras de isoladas a campo em diferentes surtos da doença. Neste trabalho, duas técnicas de marcadores moleculares foram padronizadas a fim de diferenciar as amostras de *A. pleuropneumoniae*. Outros métodos moleculares de *fingerprinting* foram

analisados, entretanto, as técnicas RAPD e ERIC foram determinadas as mais promissoras para o desenvolvimento deste trabalho.

2.3.1 Método RAPD (*Randomly Amplified Polimorphic DNA*)

É baseado na amplificação de segmentos aleatórios de DNA, com um único *primer* de nucleotídeos arbitrários, com dez pares de bases. O método detecta polimorfismos no DNA e é utilizado como marcador molecular para construção de mapeamento genético em diversas espécies (WILLIAMS *et al.*, 1990). Os marcadores RAPD também são utilizados para análises filogenéticas e de diversidades genéticas em animais, plantas e microrganismos. A vantagem deste método é que não há necessidade de conhecer a sequência genômica, pois os *primers* são decâmeros gerados randomicamente e, portanto, o exato local da hibridização é desconhecido. Assim, os oligonucleotídeos RAPD amplificam fragmentos que formam padrões de *amplicons* que, por sua vez, podem ser analisados filogeneticamente.

Apesar de o método ser rápido e pouco dispendioso, a técnica RAPD apresenta problemas de reprodutibilidade – de um laboratório para outro e, inclusive, seguindo um único protocolo (PENNER *et al.*, 1993). Em um experimento de Skroch e Nienhuis (1995), a reprodutibilidade da técnica RAPD em genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. foi de 76% e o erro de pontuação de 2%. Assim, em muitos experimentos que utilizam a técnica RAPD, mas apresentam resultados com baixa reprodutibilidade, mesmo seguindo um único protocolo, os potenciais de análise filogenética da técnica sobre outros métodos não são justificados.

2.3.2 Método ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)

A técnica de ERIC-PCR é baseada na amplificação de sequências repetitivas altamente conservadas nas regiões intergênicas do genoma bacteriano. Essas sequências foram inicialmente descritas em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (VERSALOVIC *et al.*, 1991) e têm sido utilizadas para a caracterização de bactérias fitopatogênicas e para estudos de diversidade genética em diversos microrganismos. Assim como a técnica RAPD, o método ERIC amplifica fragmentos que formam padrões de *amplicons* passíveis de serem filogeneticamente analisados. Apesar de a técnica ERIC também apresentar problemas de reprodutibilidade e portabilidade dos resultados entre os laboratórios, é mais conveniente que outros métodos – como RAPD e REP (*Restriction Endonuclease Pattern*) – por apresentar *primers* com padrões menos complexos, ou seja, maior quantidade de oligonucleotídeos que gera maior estabilidade na hibridização e menor chance de erro. Outra possível razão para o

método ERIC apresentar menor erro de portabilidade dos seus resultados é a temperatura de hibridização, que normalmente é mais alta do que o método RAPD.

Outra desvantagem que os métodos de genotipificação apresentam, incluindo o RAPD e o ERIC, é a necessidade de obter a amostra de uma colônia pura – visto que as técnicas *fingerprinting* não possuem nenhuma restrição genômica e não são específicas para um único microrganismo. Assim, métodos que possam auxiliar a genotipificação, como a identificação dos genes que codificam para as toxinas Apx e para as proteínas TbpA e TbpB devem ser considerados para complementar os estudos epidemiológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada (LBMA) – Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Porto Alegre/RS.

3.1 Extração e quantificação do DNA

Os sorotipos de referência do *A. pleuropneumoniae* foram cedidos pela Embrapa Suínos e Aves CNPSA – Concórdia. Seus DNAs foram extraídos de colônias puras utilizando o Kit QIAmp DNA Mini (Qiagen), conforme instruções dos fabricantes, e quantificados em GeneQuant 1300, com diluição de 1:10 e absorvância de 260 nm, com controle branco intercalado a cada cinco amostras. Os sorotipos de referência foram utilizados na padronização dos métodos moleculares.

Para análise filogenética, foram utilizadas 29 amostras de *A. pleuropneumoniae*, também procedentes da Embrapa Suínos e Aves CNPSA, isoladas de campo entre os anos de 1981 e 2001 (SILVEIRA, 2002). O DNA genômico das amostras de campo foi quantificado através do Kit Quant-iT dsDNA HS Assay (Invitrogen), conforme instruções dos fabricantes. A quantidade de DNA utilizada em cada reação foi de 500 pg/ μ L.

3.2 RAPD

Foram utilizados os *primers* OPG-10 e OPG-19 do conjunto G (Operon Technologies, CA), conforme prévia seleção de Silveira (2002). Cada reação continha 25 μ L de volume total e 2,5 μ L de tampão 10x e concentrações de 2,5 mM de $MgCl_2$, 2,5 U de Taq DNA Polymerase e 0,04 mM de dNTP. As concentrações dos *primers* OPG-10 e OPG-19 variaram em 1,25 – 4,6 pmol/ μ L e 2,5 – 9,2 pmol/ μ L, respectivamente, sendo que as melhores concentrações encontradas foram 2,5 pmol/ μ L para OPG-10 e 4,6 pmol/ μ L para OPG-19. As concentrações de $MgCl_2$ também foram testadas em 0,5 - 3,0 mM. As amplificações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, em termociclador Applied Biosystems. A quantidade média de material genômico utilizada foi de 1 μ L contendo 100 ng de DNA. O programa de amplificação consistia em 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 34°C por 1 minuto e 72°C por dois minutos, com extensão final de 72°C por 2 minutos e manutenção por 4°C. Foram testadas três temperaturas de hibridização, sendo que a temperatura ótima para o OPG-10 foi de 34°C enquanto que para o OPG-19 foi de 36°C.

3.3 ERIC

Na padronização da técnica, vários testes foram realizados para definir a concentração ótima dos reagentes. As quantidades e concentrações iniciais dos reagentes foram extraídas dos artigos de referência do método (VERSALOVIC *et al.*, 1991; VAN DER STOEP, 2006). Após a padronização, cada reação continha 25 µL de volume total e 2,5 µL de tampão 10x, e concentrações de 3 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polymerase, 0,04 mM de dNTP e ambos os *primers* com 20 pmol/µL. A quantidade média de material genômico utilizada foi de 1 µL contendo 500 pg de DNA. As amplificações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL, em termociclador Applied Biosystems. O programa de amplificação consistia em 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e 30 segundos, com extensão final de 72°C por 20 minutos e manutenção por 4°C. O tempo de extensão de cada ciclo foi testado em 2 minutos e 30 segundos e em 8 minutos, sendo que não houve diferença entre os dois tempos de extensão verificados.

3.4 Eletroforese

Os produtos da amplificação da técnica RAPD foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 70 V, em tampão TBE 1x por 3 horas. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 kb DNA Ladder (InvitrogenTM) e o corante utilizado foi o Blue Green (LGC Biotecnologia).

Os produtos da amplificação da técnica ERIC foram separados em eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 70 V em tampão TBE 1x por 3 horas. Também foram separados em gel de poliacrilamida 5%. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 250 pb DNA Ladder (InvitrogenTM) e o corante utilizado foi o Blue Green (LGC Biotecnologia). No gel de poliacrilamida foi utilizado o corante SYBR Gold, com 6x Gel-loading Buffer II.

3.5 Análise filogenética

Os géis da eletroforese contendo os produtos da amplificação foram fotografados e as fotos foram analisadas através do *software* Gel-Pro Analyzer. O padrão de *amplicons* de cada amostra analisada permitiu a construção de uma matriz de similaridade genética, utilizando o código binário para a presença (1) ou ausência (0) de fragmentos amplificados. A matriz binária gerada foi analisada pelo *software* RAPDistance (ARMSTRONG, 1994), na qual foram calculadas as distâncias filogenéticas das amostras, através do coeficiente de Nei & Li (1979). Após, foi construído um fenograma a fim de representar graficamente o padrão de divergência genética.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes iniciais de padronização da técnica RAPD evidenciaram que a mesma possui baixa reprodutibilidade. Em vários experimentos, amostras em duplicata divergiram quanto ao padrão de *amplicons* obtidos (Figura 4). A técnica foi aplicada somente nos sorotipos de referência do *A. pleuropneumoniae*. Como já citado neste trabalho, já foi evidenciado por outros trabalhos o problema com a reprodutibilidade da técnica RAPD. Assim, o método deixou de ser útil aos seus propósitos e continuou-se com a pesquisa e o desenvolvimento de novos métodos de genotipificação.

Dentre os métodos moleculares disponíveis, o ERIC-PCR é um dos mais promissores. Com a aplicação da técnica ERIC nos sorotipos de referência, foi possível obter um padrão de amplificação inequívoco para o DNA de cada um dos sorotipos analisados (Figura 5). Além da diferenciação efetiva dos sorotipos de referência, a aplicação da técnica em amostras em duplicata demonstrou reprodutibilidade (Figura 6). Após completa padronização, a técnica foi aplicada em 29 amostras de campo. Todas as amostras geraram padrões de amplificação diferenciados, inclusive em amostras de mesmo sorotipo.

O padrão de *amplicons* gerado pelo ERIC-PCR permitiu a construção de uma matriz binária passível de detalhada análise filogenética, impossível de ser feita pela simples inspeção visual do resultado da eletroforese em gel de agarose. Através da análise filogenética, as amostras de campo puderam ser individualmente diferenciadas e agrupadas em subpopulações conforme o padrão de *amplicons* gerados pelo ERIC-PCR (Figura 7). Os padrões de *amplicons* e a análise filogenética das 29 amostras de campo foram divididos em três fenogramas (Figura 7 A, B e C) que não foram comparados ou analisados como um todo. Isso se deve a não padronização efetiva de um marcador molecular único, que pudesse ser utilizados nas três análises. Assim, os fenogramas devem ser analisados separadamente.

Na Figura 14A podemos visualizar o agrupamento das amostras APPS2 (sorotipo 2), 6743 (sorotipo 5b) e 6636 (sorotipo 3), que apesar de serem sorotipificadas em diferentes grupos, foram agrupadas em uma mesma subpopulação através da genotipificação. Assim, podemos assumir um maior poder discriminatório da técnica ERIC quando comparada à sorotipificação. Também comprovado pela diferenciação efetiva de amostras não sorotipificáveis – ou seja, que puderam ser identificadas e diferenciadas através da técnica de genotipificação, quando não puderam pela de sorotipificação.

Analisando as amostras 6744 e 6745 (Figura 14B), ambas classificadas como sorotipo 5b, é possível perceber a semelhança e a proximidade filogenética das amostras. Como análise epidemiológica, poder-se-ia supor que ambos isolados pertencem à mesma cepa de campo, ou ainda, de mesma origem genética. Assim como nas amostras 6796 e 6800, também classificadas como sorotipo 5b (Figura 14C) que, dado o grau de proximidade, também poderia supor uma origem em comum entre os isolados.

As informações que podem ser extraídas dessas análises certamente resultarão em um melhor entendimento epidemiológico dos surtos causados pelo *A. pleuropneumoniae*, podendo, inclusive, obter sucesso na rastreabilidade dos isolados.

5 CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados, conclui-se que a técnica ERIC permite a diferenciação efetiva das amostras isoladas de campo de *A. pleuropneumoniae*. A partir dos resultados obtidos, é possível a realização de estudos epidemiológicos mais detalhados do agente no nosso meio. A técnica RAPD não alcançou seus objetivos durante a padronização devido à falta de reprodutibilidade do método.

A aplicação da técnica ERIC pode ser uma ferramenta importante na análise de isolados de surtos de pleuropneumonia suína, permitindo a caracterização e diferenciação destas amostras. Essas informações, possíveis pela aplicação da técnica em isolados de surtos, serão relevantes para o entendimento e estudos da epidemiologia da doença, com reflexos práticos nas medidas de controle e prevenção. Outro ponto chave no controle do agente através do ERIC-PCR é a possibilidade de rastrear as cepas isoladas em cada surto, principalmente em granjas de controle por vacinação e granjas que alcancem, ou busquem alcançar, a erradicação da pleuropneumonia suína.

A pesquisa alcançou seus objetivos na diferenciação dos isolados e, apesar de não obter um marcador molecular padronizado, teve sucesso em comprovar o poder discriminatório da técnica ERIC. Porém, faz-se necessária a padronização de um marcador molecular que permita a comparação e a análise de múltiplos fenogramas.

Ainda, outros métodos devem ser pesquisados e padronizados em experimentos futuros para auxiliar a sorotipificação e a genotipificação do agente. Entre eles podemos citar a identificação dos genes que codificam para as toxinas Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins) e as técnicas RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). As técnicas RFLP e AFLP são métodos adicionais de genotipagem que possibilitam a análise de produtos de clivagem por endonucleases de restrição, devendo ser comparados ao método ERIC quanto à sua eficácia, sensibilidade e reprodutibilidade, podendo inclusive substituir o método ERIC na diferenciação das amostras isoladas. A identificação das toxinas Apx auxiliaria na sorotipificação e no entendimento da virulência dos isolados, visto que as toxinas Apx são o fator de maior patogenicidade do agente. Todos os métodos devem ser capazes de contribuir para o estudo epidemiológico do agente e para a implantação de protocolos de profilaxia e controle da pleuropneumonia suína.

REFERÊNCIAS

- ABIPECS. **Exportação Mundial de Carne Suína**. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>>. Acesso em: 08 jul. 2013.
- ALBERTON, G. C.; ROCHA, D. L.. Como diagnosticar corretamente doenças respiratórias em suínos nas fases de crescimento e terminação. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 38, p.29-35, 2010.
- ARMSTRONG, J. S. **The RAPDistance**. 1994. Disponível em: <<http://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistanceor>>.
- COELHO *et al*; Pleuropneumonia suína causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* – diagnóstico e estratégias de controlo. **Revista Portuguesa de Medicina Veterinária**, Vila Real, n. 99, p. 193-198, 2004.
- COSTA, A. P. P. *et al*. Estudo de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento. **Cadernos de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, São Paulo, v. 7, n. 1, p.112-131, 2007.
- CRUIJSEN *et al*; Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. **Infection and Immunity**, Lelystad, v. 60, n. 11, p. 4867-4871, Nov. 1992.
- DAL BEM, E. L.; Epidemiologia e anatomopatologia de lesões pulmonares de suínos em um matadouro em Cascavel – PR. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- DUBREUIL *et al*; *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. **Animal Health Research Reviews**, Québec, v. 1, p. 73-93, 2000.
- GAGNÉ, A. *et al*; Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 251-254n 1, v. 36, p. 251-254, 1998.
- HAESEBROUCK, F. *et al*; *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. **Veterinary Microbiology**, Merelbeke, v. 58, p. 239 – 249, 1997.
- HIRSH, D.C.; MacLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L.; **Veterinary Microbiology**, 2th ed.; Ames, Iowa: Blackwell, 2004, p. 91-94.
- IBGE. **Censo agropecuário 1996**. Brasília, Janeiro de 1996. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>>. Acesso em: 05 jan. 2013.

JACOBSEN, M. J.; NIELSEN, J. P.; NIELSEN, R.; Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. **Veterinary Microbiology**, Copenhagen, v. 49, p. 159-168, 1996.

KOKOTOVIC, B.; ANGEN, Ø.; Genetic Diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal Of Clinical Microbiology**, Copenhagen, v. 45, n. 12, p.3921-3929, dez. 2007.

MITTAL, K.R., BOURDON, S.; BERROUARD, M.; Evaluation of counterimmunoelectrophoresis for serotyping *Actionabacillus peluopneumoniae* isolates and detection of type-specif antigens in lungs of infected pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, Quebec, n. 31, p. 2339, 1993.

MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S.; Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemphilus pleuropneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, Quebec, v. 15, n. 6, p. 1019-1023, 1982.

MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S.; Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, Quebec, n. 18, p. 1351, 1983.

MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S.; Quantitation of serotype-specif and cross-reacting group-specif antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6 and 8. **Journal of Clinical Microbiology**, Quebec, n. 26, p. 985, 1988.

MORES, N.; ZANELLA, J. C. **Perfil sanitário da suinocultura no Brasil**. Fevereiro de 2006. Disponível em: <<http://www.nordeste rural.com.br/nordeste rural/matler.asp?newsId=3402>>. Acesso em: 08 jul. 2013.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **National Academy of Sciences of the United States of America Proceedings**, Washington, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

OLANDER, H.J.; A septicemic disease of swine and its causative agent, *Haemophilus paraahaemolyticus*. **Ph.D. Thesis**, University of California, 1963.

PATTISON, I.H.; HOWELL, D.C.; ELLIOTT, J.; A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesion. **J. Comp., path.** 67, p. 320-329, 1957.

PENNER, G. A. *et al.* **Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories**. Ontario, 1993. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/2/4/341.full.html#ref-list-1>>. Acesso em: 04 jul. 2013.

PUENTE-REDONDO, V. A. *et al.*; Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. **Res. Microbiol**, Spain, n. 151, p.669-681, 3 mar. 2000.

QUINN, P.J *et al*; **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**; Porto Alegre, RS: Artmed, 2005, p. 138-142.

RODRIGUES, G. Z. *et al*. Evolução da produção de carne Suína no Brasil: uma análise Estrutural-diferencial. **Revista De Economia E Agronegócio**, v. 6, n. 3, p.343-366, 25 jan. 2009.

SHOPE, R.E.; Porcine contagious pleuropneumonia – I experimental transmission, etiology and pathology. **Albert Einstein College of Medicine**, New York, p. 43-49, nov. 1963.

SILVEIRA, C.L.V. Genotipificação de amostras sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de RAPD. **Tese de Mestrado em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

SKROCH, P.; NIENHUIS, J.; Impact of scoring error and reproducibility RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. **Theoretical And Applied Genetics**, v. 91, n. 6-7, p.1086-1091, 01 nov. 1995.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; **Doença dos suínos**, Brasil: Cênone, 2007, p. 182-186.

STRAW, B. E. *et al*; **Diseases of swine**; 9th edition, USA: Blackwell Publishing, 2006, p. 563-576.

USDA. **Livestock and Poultry**: World Markets and Trade. April 2013. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2013.

WILKINSON, J.; ROCHA, R.. **Uma análise dos setores de carne bovina, suína e de frango**. Maio de 2005. Disponível em: <http://www.redmercosur.org/iepcim/RED_MERCOSUR/biblioteca/ESTUDOS_BRASIL/BRA_80.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2013.

WILLIAMS, J. G. K. *et al*; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p.6531-6535, 1990.

VAN DER STOEP, A.O; Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis*. **Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular**, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2006.

VAN LEENGOED, L.A.; KAMP, E.M.; POL, J.M.A.; Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. **Veterinary Microbiology**, Lelystad, v. 19, p. 337-349, 1989.

VERSALOVIC *et al.*, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acid Research**, Houston, v.19, n. 24, p.6823-6831, 1991.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.. **Biologia Molecular Básica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 331-380.

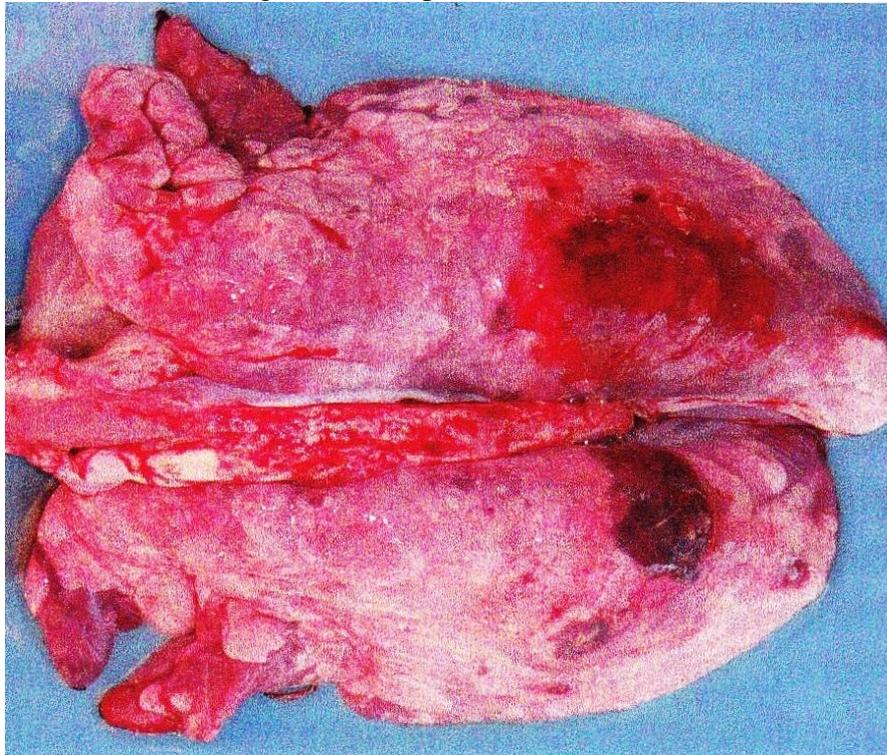
ANEXO – FIGURAS

Figura 1 – Suíno em decúbito esternal.



Fonte: COELHO, 2004.

Figura 2 – Focos de hemorragia, necrose e pleurite nos lobos diafragmáticos do pulmão.



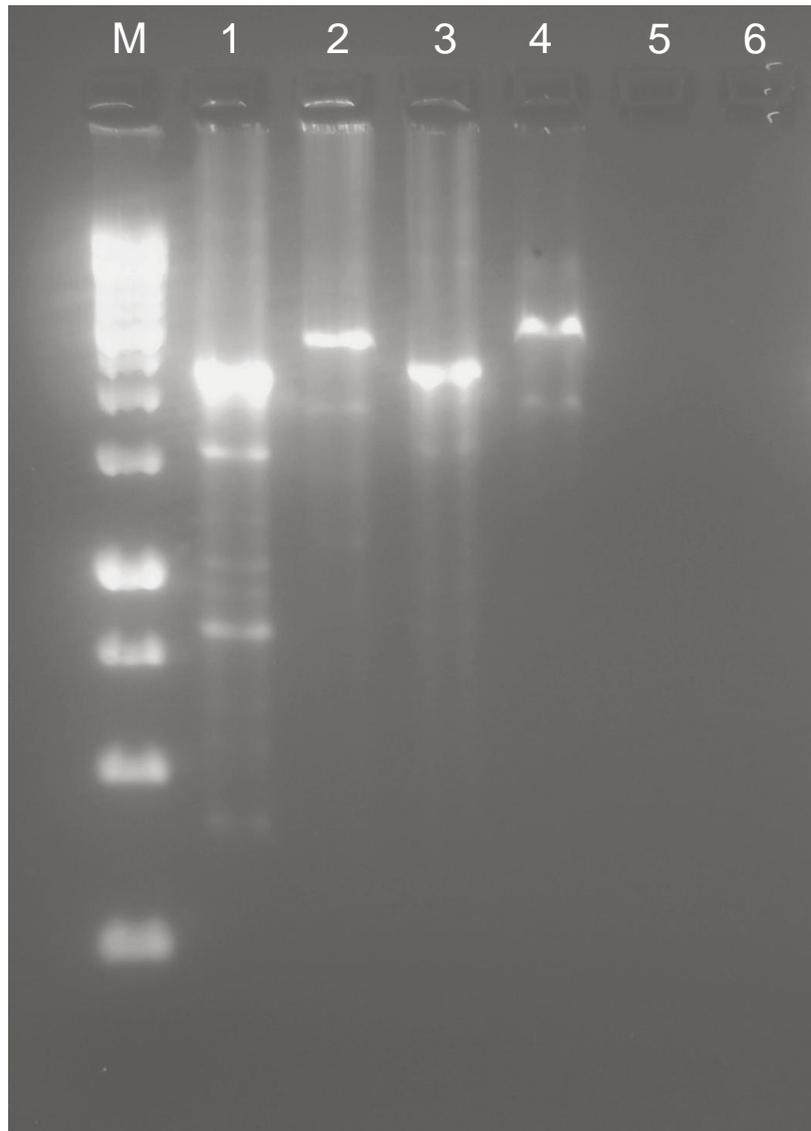
Fonte: SOBESTIANSKY, 2007.

Figura 3 – Placa com *A. pleuropneumoniae*, mostrando fenômeno de satelismo (CAMP).



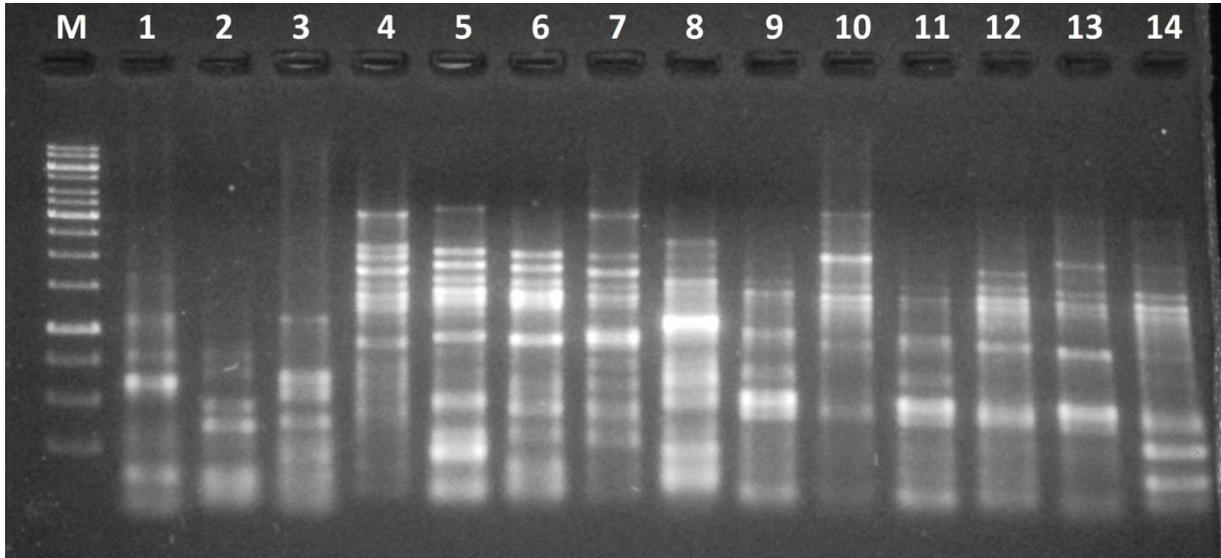
Fonte: SOBESTIANSKY, 2007.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% de *amplicons* obtidos pela aplicação da técnica de RAPD ao DNA de *A. pleuropneumoniae*. Legenda: M: marcador de peso molecular (250 pb); Caneletas 1 e 2: sorotipo 1 com DNA diluído em 1:10; Caneletas 3 e 4: sorotipo 1 com DNA diluído em 1:5; Caneletas 5 e 6: controles negativos. Em todas as amostras foi utilizado o *primer* OPG-19.



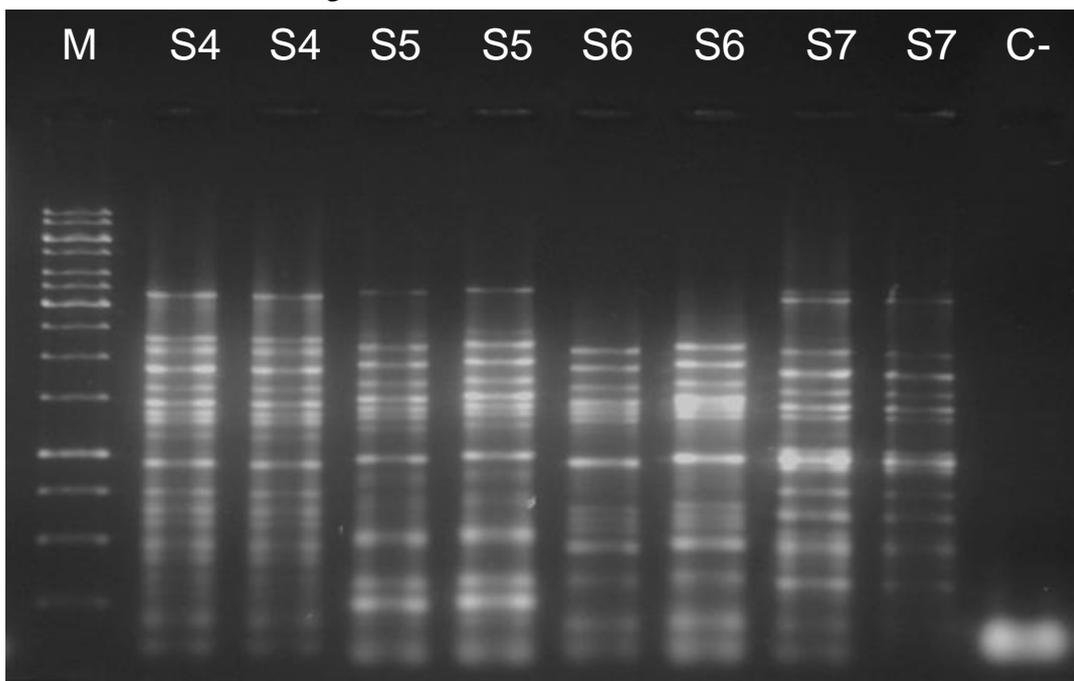
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% de *amplicons* obtidos pela aplicação da técnica de ERIC-PCR ao DNA de *A. pleuropneumoniae*. Legenda: M: marcador de peso molecular (1 kb); 1 a 14: *amplicons* obtidos a partir do DNA dos sorotipos 1 a 14, respectivamente, de *A. pleuropneumoniae*.



Fonte: Arquivo pessoal.

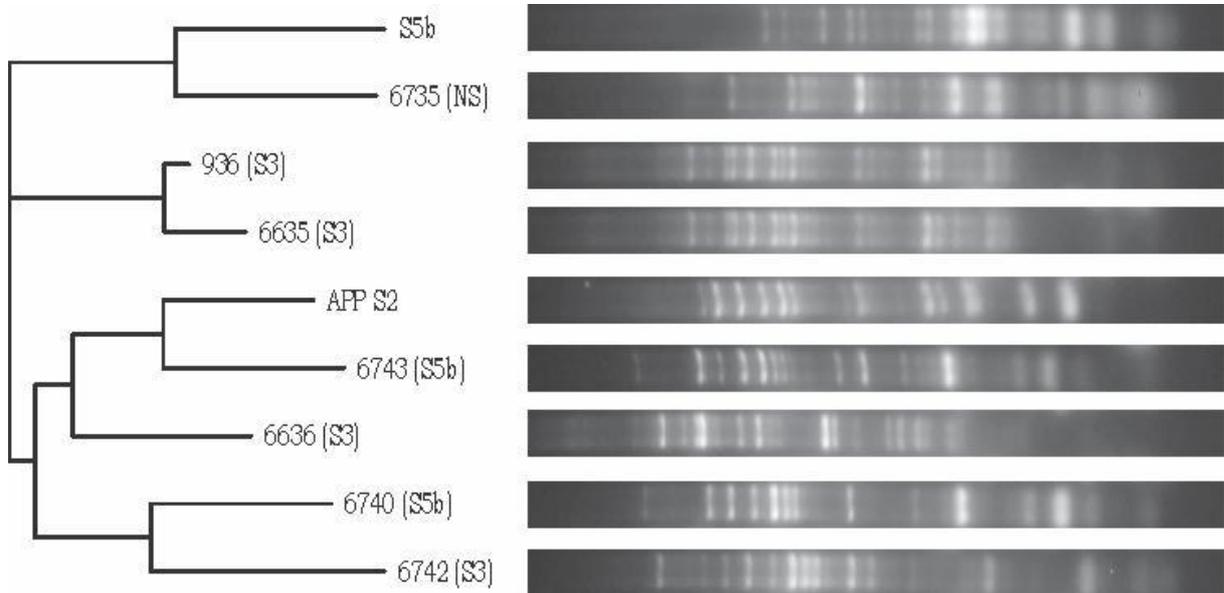
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% de *amplicons* obtidos pela aplicação da técnica de ERIC-PCR ao DNA de *A. pleuropneumoniae*. Legenda: M: marcador de peso molecular (1 kb); S4, S5, S6 e S7: respectivos sorotipos de referência em duplicata; C-: controle negativo.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7A – Análises filogenéticas das amostras de campo de *A. pleuropneumoniae*.

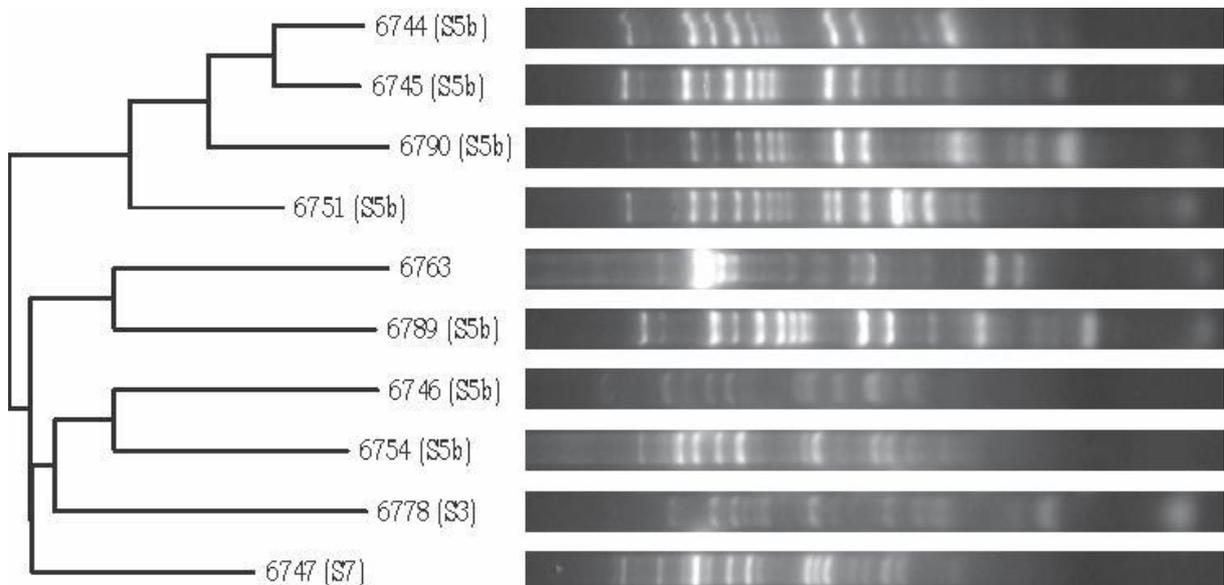
Legenda: esquerda: árvore filogenética obtida a partir da matriz binária gerada pelos *amplicons* do ERIC-PCR; direita: eletroforese em gel de agarose Ultra-Pure 1,5% dos *amplicons*.



Fonte: Arquivo pessoal.

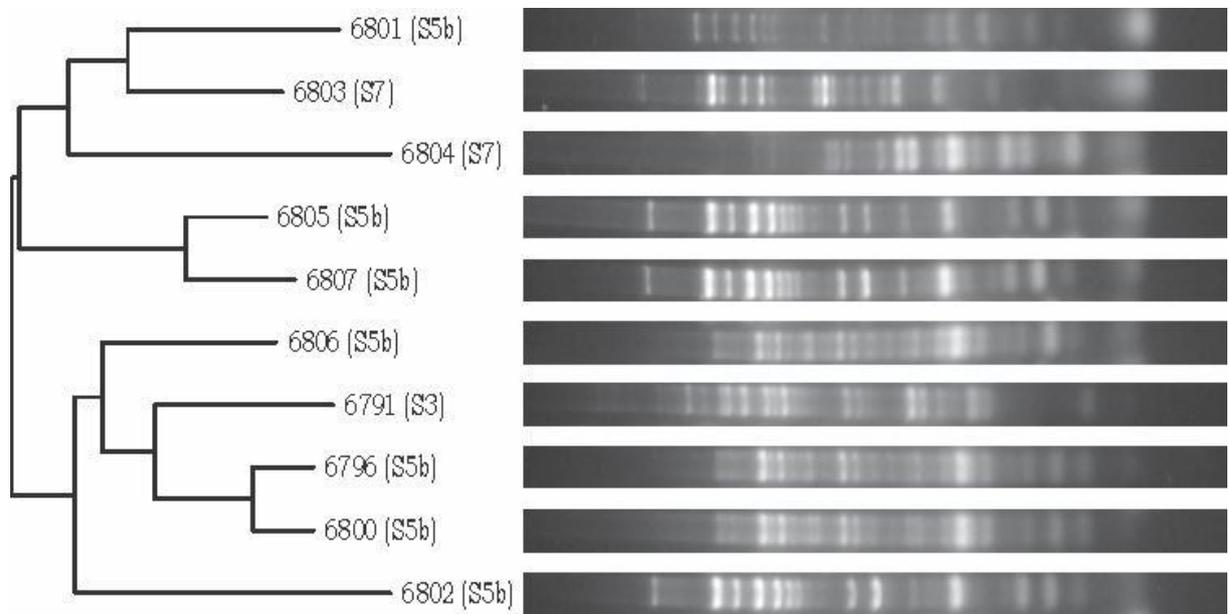
Figura 7B – Análises filogenéticas das amostras de campo de *A. pleuropneumoniae*.

Legenda: esquerda: árvore filogenética obtida a partir da matriz binária gerada pelos *amplicons* do ERIC-PCR; direita: eletroforese em gel de agarose Ultra-Pure 1,5% dos *amplicons*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7C – Análises filogenéticas das amostras de campo de *A. pleuropneumoniae*.
Legenda: esquerda: árvore filogenética obtida a partir da matriz binária gerada pelos *amplicons* do ERIC-PCR; direita: eletroforese em gel de agarose Ultra-Pure 1,5% dos *amplicons*.



Fonte: Arquivo pessoal.