

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GENOTIPIFICAÇÃO DE AMOSTRAS
SOROTIPIFICÁVEIS E NÃO SOROTIPIFICÁVEIS DE
Actinobacillus pleuropneumoniae ATRAVÉS DE RAPD

Clarissa Silveira Luiz Vaz

Porto Alegre, 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GENOTIPIFICAÇÃO DE AMOSTRAS SOROTIPIFICÁVEIS E NÃO
SOROTIPIFICÁVEIS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATRAVÉS DE RAPD

CLARISSA SILVEIRA LUIZ VAZ

Dissertação apresentada como
requisito para obtenção do grau
de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de
Biologia Celular Molecular

PORTO ALEGRE
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CLARISSA SILVEIRA LUIZ VAZ

Genotipificação de amostras sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de RAPD

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Itamar Antônio Piffer
Membro da Comissão

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein
Membro da Comissão

Prof. Dr. David Driemeier
Membro da Comissão

Porto Alegre, 28 de março de 2002.

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Ceroni da Silva, pela orientação, amizade, ensinamentos e sugestões no decorrer do trabalho.

A Dra. Irene Schrank, pela contribuição e sugestões para o desenvolvimento das atividades pertinentes ao trabalho.

Ao Dr. Itamar Piffer, pela gentil disponibilidade em colaborar com o trabalho.

À amiga Cátia, não só pelos ensinamentos, fundamentais na execução das atividades; mas também pela amizade sincera e pelo exemplo de persistência.

Aos colegas e amigos Deise, Rúbia e Mateus, por sua amizade, incentivo e convivência, os quais facilitaram o prosseguimento do curso; e pelas valiosas sugestões para a redação do trabalho.

Ao amigo Hermides, pelo incentivo e auxílio na fase final do curso.

A todos os amigos com quem convivi no Centro de Biotecnologia, especialmente ao Carlos, Cristopher e Guilherme, pela amizade e colaboração em todos os momentos.

Aos colegas dos laboratórios 213, 210, 205, 107 e do Projeto Genoma pela amizade e convivência.

Aos funcionários da Embrapa Suínos e Aves pelo gentil envio das amostras, especialmente à Maria Fávero pela atenção dispensada a mim.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, principalmente às amigas Sandra, Marjo, Laura, Joice, Rose e Diocela.

Aos funcionários das secretarias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, e do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia, em especial à Carmem, Vera e Sílvia; sempre atenciosas quando solicitadas.

À Clara, ao Hamilton e ao Igor, a quem devo a força para realizar este trabalho. Agradeço o amor, a confiança e a compreensão depositados em mim; o que permitiu que eu prosseguisse em todos os momentos difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 A inserção da suinocultura na economia.....	16
1.2 Enfermidades do trato respiratório dos suínos.....	18
1.3 Pleuropneumonia suína.....	21
1.4 Transmissão da enfermidade.....	22
1.4.1 Patogenia da enfermidade.....	22
1.4.2 Sinais clínicos de pleuropneumonia.....	24
1.4.3 Lesões macroscópicas e microscópicas.....	25
1.4.4 Diagnóstico da pleuropneumonia suína.....	27
1.4.5 Terapia e profilaxia da enfermidade.....	29
1.4.6 Implicações econômicas da enfermidade.....	30
1.5 Bactérias NAD-dependente isoladas do trato respiratório de suínos.....	31
1.6 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	33
1.6.1 Sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	33
1.6.2 Caracterização fenotípica de <i>A. pleuropneumoniae</i>	35
1.6.3 Isolamento de <i>A. pleuropneumoniae</i>	37
1.6.4 Virulência de <i>A. pleuropneumoniae</i>	41
1.6.4.1 Exotoxinas de <i>A. pleuropneumoniae</i>	42
1.6.4.2 Cápsula de <i>A. pleuropneumoniae</i>	45
1.6.4.3 Lipopolissacarídeos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	46
1.6.4.4 Proteínas de <i>A. pleuropneumoniae</i> ligantes da transferrina.....	46
1.6.4.5 Proteínas de membrana externa de <i>A. pleuropneumoniae</i>	47
1.6.5 Resposta imune e imunização contra <i>A. pleuropneumoniae</i>	48
1.6.6 Sorotipificação de <i>A. pleuropneumoniae</i>	51
1.7 Genotipificação de microorganismos.....	53
1.7.1 RAPD como método de genotipificação.....	57
1.8 Objetivos.....	61
2. MATERIAIS E MÉTODOS	62
2.1 Amostras de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	62
2.1.1 Amostras isoladas de campo.....	62
2.1.2 Amostras de referência de <i>A. pleuropneumoniae</i>	64
2.2 Meios de cultivo.....	65
2.3 Extração do DNA genômico.....	66
2.4 Oligonucleotídeos.....	66
2.5 Padronização da técnica de RAPD.....	67
2.6 Validação da técnica de RAPD.....	68

2.7 Aplicação da técnica na caracterização de amostras não sorotipificáveis de <i>A. pleuropneumoniae</i>	69
2.8 Análise dos resultados.....	69
3. RESULTADOS.....	71
3.1 Padronização da técnica de RAPD.....	71
3.1.1 Seleção dos <i>primers</i>	71
3.1.2 Aplicação da técnica em amostras de referência de <i>A. pleuropneumoniae</i>	71
3.2 Aplicação da técnica de RAPD em amostras sorotipificadas de <i>A. pleuropneumoniae</i> isoladas de campo.....	73
3.2.1 Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia.....	73
3.2.1.1 Resultados obtidos com o <i>primer</i> OPG-10	73
3.2.1.2 Resultados obtidos com o <i>primer</i> OPG-19 em amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia.....	80
3.2.2 Amostras isoladas de suínos sem sinais clínicos da enfermidade, procedentes de rebanhos	81
3.2.2.1 Resultados obtidos com o <i>primer</i> OPG-10	81
3.2.2.2 Resultados obtidos com o <i>primer</i> OPG-19	82
3.3 Aplicação da técnica de RAPD em amostras não sorotipificáveis de <i>A. pleuropneumoniae</i>	85
3.3.1 Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia.....	85
3.3.1.1 Resultados obtidos com o <i>primer</i> OPG-10	85
3.3.1.2 Resultados obtidos com o <i>primer</i> OPG-19 em amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia.....	88
3.3.2 Amostras isoladas de suínos sem sinais clínicos da enfermidade, procedentes de rebanhos	89
3.4 Aplicação da técnica de RAPD em amostras de <i>A. minor</i> e <i>A. indolicus</i> isoladas de suínos sem sinais clínicos da enfermidade, procedentes de rebanhos.....	93
3.5 Avaliação dos resultados.....	94
4. DISCUSSÃO.....	96
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	grau Celsius
µg	micrograma
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAMP	<i>Christie, Atkin, Munch-Peterson reaction</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	força gravitacional
kb	kilobase
kDA	kilodalton
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
OPG	Operon- kit G
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	potencial de hidrogênio
PIB	Produto interno bruto
pmol	picomolar
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RTX	<i>repeat toxins</i>

SDS	dodecilsulfato de sódio
SPF	<i>specific pathogen free</i>
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Polimorfismo de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-10 nas amostras de referência de <i>A. pleuropneumoniae</i>	72
FIGURA 2- Polimorfismo de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-19 nas amostras de referência de <i>A. pleuropneumoniae</i>	73
FIGURA 3- Polimorfismo de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-10 em diferentes sorotipos	74
FIGURA 4- Diferentes perfis de RAPD detectados pelo <i>primer</i> OPG-10 em amostras do sorotipo 3	75
FIGURA 5- Perfil de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-10 na amostra 6829 do sorotipo 3	76
FIGURA 6- Detecção por PCR dos genes <i>apxIA</i> e <i>apxIIA</i> na amostra 6829 do sorotipo 3	77
FIGURA 7- Perfil de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-10 para as amostras do sorotipo 4	78
FIGURA 8- Detecção por PCR dos genes <i>apxIA</i> e <i>apxIIA</i> nas amostras de sorotipo 4 isoladas de casos clínicos	78
FIGURA 9- Detecção por PCR dos genes <i>cpx</i> nas amostras de sorotipo 4 isoladas de campo	79
FIGURA 10- Produtos de RAPD detectados pelo <i>primer</i> OPG-10 que caracterizaram os sorotipos.....	80
FIGURA 11- Perfil de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-19 em isolados de casos clínicos de pleuropneumonia	81
FIGURA 12- Perfil de RAPD de amostra do sorotipo 3 divergente, detectado pelo <i>primer</i> OPG-19	82
FIGURA 13- Perfil de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-10 no sorotipo 12	83
FIGURA 14- Perfil de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-19 no sorotipo 12	83

FIGURA 15- Representação esquemática da distribuição dos produtos de RAPD detectados pelo <i>primer</i> OPG-10 nos diferentes sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	84
FIGURA 16- Representação esquemática da distribuição dos produtos de RAPD detectados pelo <i>primer</i> OPG-19 nos diferentes sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	84
FIGURA 17- Genotipificação de amostras não sorotificáveis de <i>A. pleuropneumoniae</i> utilizando o <i>primer</i> OPG-10	85
FIGURA 18- Genotipificação da amostra não sorotificável 7300 através do perfil detectado pelo <i>primer</i> OPG-10	86
FIGURA 19- Genotipificação da amostra não sorotificável 6967 através do perfil detectado pelo <i>primer</i> OPG-10	87
FIGURA 20- Perfil de RAPD detectado pelo <i>primer</i> OPG-10 na amostra não sorotificável 6941	87
FIGURA 21- Perfis de RAPD divergentes, detectados pelo <i>primer</i> OPG-19, em amostras sorotificáveis	88
FIGURA 22- Caracterização da amostra não sorotificável 7047 pelo <i>primer</i> OPG-10	90
FIGURA 23- Amostras NAD-dependente não caracterizados por RAPD, isoladas de suínos sem sinais clínicos	91
FIGURA 24- Perfil de RAPD detectado pelos <i>primers</i> OPG-10 e OPG-19 para <i>A. minor</i> e <i>A. indolicus</i>	94
FIGURA 25- Relação filogenética estabelecida pelo programa <i>RAPDistance</i> para os perfis de RAPD detectados pelos <i>primers</i> OPG-10 e OPG-19 nas amostras de <i>A. pleuropneumoniae</i> analisadas	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia	63
TABELA 2- Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia, sorotificadas no ano de 2001	63
TABELA 3- Amostras NAD-dependente isoladas de rebanhos	64
TABELA 4- Amostras de referência dos sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	65
TABELA 5- Sequências dos <i>primers</i> utilizados	67
TABELA 6- Relação das exotoxinas ApxA secretadas pelos diferentes sorotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	75
TABELA 7- Amostras não sorotificáveis de <i>A. pleuropneumoniae</i> caracterizadas por RAPD	89
TABELA 8- Resultados da genotipificação por RAPD das amostras de <i>A. pleuropneumoniae</i>	92
TABELA 9- Amostras não sorotificáveis isoladas de leitões de rebanhos sem sinais clínicos, analisadas através de RAPD	93

RESUMO

Actinobacillus pleuropneumoniae é o agente etiológico da pleuropneumonia suína, enfermidade amplamente distribuída no rebanho suíno mundial, responsável por prejuízos econômicos relevantes. Possui 12 sorotipos, determinados por técnicas de sorotipificação baseadas nos antígenos capsulares. A similaridade estrutural destes antígenos é responsável por reações cruzadas, observadas entre os sorotipos 1, 9 e 11, sorotipos 3, 6 e 8, e sorotipos 4 e 7; o que pode dificultar a sorotipificação. Além disso, é descrita a ocorrência de amostras não sorotificáveis. O conhecimento do sorotipo prevalente nos surtos da enfermidade é necessário aos programas de profilaxia.

Procurando contornar as dificuldades normalmente encontradas na sorotipificação de *A. pleuropneumoniae*, a técnica de RAPD foi avaliada na genotipificação de amostras sorotificáveis e não sorotificáveis do agente. Foram utilizadas amostras ATCC dos 12 sorotipos e amostras dos sorotipos 1, 3, 4, 5a, 5b, 7, 11 e 12 isolados no Brasil. Os *primers* OPG-10 e OPG-19, utilizados individualmente nas reações, foram mais adequados para a diferenciação dos sorotipos.

O *primer* OPG-19 detectou polimorfismos semelhantes entre os sorotipos 1, 3, 4, 5, e 11; e sorotipos 7 e 12. O perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 diferenciou os isolados de campo dos sorotipos 1, 7, 11 e 12. Os sorotipos 3 e 5 apresentaram padrão de RAPD semelhantes, sendo diferenciados pelo perfil de exotoxinas característico, determinado previamente através de PCR. Este *primer* identificou quatro diferentes perfis de RAPD no sorotipo 3. Um destes foi semelhante ao obtido com o sorotipo 11. Neste isolado, foi detectada a presença dos genes para ApxI e ApxII, característicos do sorotipo 11.

As amostras do sorotipo 4 apresentaram perfil de RAPD semelhante ao identificado nos sorotipos 3 ou 5 com o *primer* OPG-10, sendo identificadas, por PCR, a presença dos genes para ApxI e ApxII, os quais não são característicos do sorotipo. Estas amostras foram isoladas em anos posteriores às amostras dos sorotipos 3 e 5 analisadas.

Foi possível caracterizar 13 das 14 amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* obtidas de suínos com sinais clínicos da doença. Entre as 4 amostras não sorotipificáveis isoladas de leitões sem sinais clínicos, apenas uma foi caracterizada através de RAPD. É possível que as demais amostras sejam outras bactérias NAD-dependente isoladas do trato respiratório de suínos.

Amostras caracterizadas como *A. minor* e *A. indolicus* apresentaram perfis de RAPD divergentes dos identificados em isolados puros de *A. pleuropneumoniae*, comprovando a capacidade da técnica na caracterização do agente. Diferentes amostras do mesmo sorotipo de *A. pleuropneumoniae* apresentaram polimorfismos de RAPD idênticos, demonstrando reprodutibilidade da técnica.

Os resultados comprovam a capacidade de tipificação de *A. pleuropneumoniae* através de RAPD. A pesquisa de *primers* adequados para a diferenciação dos sorotipos 3, 4 e 5 deve aprimorar sua caracterização, o que pode vir a contribuir com as técnicas de sorotipificação tradicionalmente utilizadas, ou permitir o uso como método de confirmação nas amostras cuja sorotipificação é problemática.

ABSTRACT

The swine pleuropneumonia is a highly contagious disease caused by the bacterium *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The disease is spread worldwide, being responsible for significant economic losses. Until now, 12 serotypes have been described, determined by methods involving the detection of capsular antigens. Due to structural similarities in these antigens, cross reactions have been reported between serotypes 1, 9 and 11; serotypes 3, 6 and 8; serotypes 4 and 7; leading to difficulties in the serotyping. Besides, there are isolates that are not serotypeable. It should be pointed out that the determination of the prevalent serotype in outbreaks of the disease is necessary for taking the correct prophylactic measures.

Taking into account all these difficulties in serotyping *A. pleuropneumoniae*, we have evaluated the RAPD technique for the genotyping of both serotypeable and non-serotypeable isolates. In this study, the ATCC reference strains for the 12 serotypes and isolates from Brazil (serotypes 1, 3, 4, 5a, 5b, 7, 11 and 12) were analyzed. Two primers, named OPG-10 and OPG-19, were the most suitable to analyze the different *A. pleuropneumoniae* isolates. These primers were used isolated in RAPD reactions.

A very similar RAPD pattern between serotypes 1, 3, 4, 5, and 11; as well as between serotypes 7 and 12, was observed using primer OPG-19. The OPG-10 primer has been shown to be the most appropriate to differentiate field isolates belonging to the serotypes 1, 7, 11 and 12. Samples from serotypes 3 and 5 gave rise to similar RAPD patterns, being differentiated by the RTX toxin genes profile determined by PCR. Samples belonging to the serotype 3 presented four divergent RAPD patterns, as detected by the OPG-10 primer. One of these RAPD patterns was identical to the one from serotype 11. The RTX toxin genes profiling by PCR indicated the presence of genes for toxins ApxI and ApxII in this isolate.

Serotype 4 samples presented a RAPD pattern similar to the one observed in serotypes 3 or 5, detected by the OPG-10 primer. The *apxI* and *apxII* genes, that are not present in this serotype, were detected in these samples. These samples were isolated in recent years compared with the serotypes 3 and 5 samples analysed in the present study.

Using the RAPD profiling was possible to characterize 13 out of 14 non-serotypeable isolates obtained from animals displaying clinical signs of the disease. Among the 4 non-serotypeable isolates obtained from pigs without clinical signs, only one was characterized by RAPD. One possibility is that the samples that could not be characterized are, in fact, other NAD-dependent bacteria isolated from the upper respiratory tract of swines.

Samples identified as *A. minor* and *A. indolicus* presented a very diverse RAPD pattern when compared to *A. pleuropneumoniae*, further supporting the use of this technique to characterize the latter species. Moreover, different isolates belonging to the same serotype presented the same RAPD pattern, indicating that the technique was reproducible.

Taken together, the results presented in this work indicate the potential of using the RAPD technique to differentiate between serotypes of *A. pleuropneumoniae*. However, further studies should be carried out in order to try to find more adequate primers to differentiate serotypes 3, 4 and 5 and the others serotypes described in *A. pleuropneumoniae*.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.

1.1 A inserção da suinocultura na economia.

O aumento da demanda por alimentos é uma conseqüência esperada diante do crescimento da população mundial. Neste contexto, a suinocultura destaca-se como uma das atividades primárias que apresentaram maior desenvolvimento, tornando-se altamente tecnificada e geradora de renda; por conseguinte, fornecendo um produto de qualidade aos consumidores. A produção mundial de carne suína vem crescendo desde 1977 numa taxa de 2,07% ao ano, quando a produção era de 42,9 milhões de toneladas de carne; alcançando 86,4 milhões de toneladas em 1998 (EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA, 2001). Em âmbito mundial, é atualmente a carne mais consumida, mesmo em países cuja população dispõe de baixa renda (GOMES, 1993), mantendo a média de 14,52 Kg por habitante ao ano em 1998 (EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA, 2001).

Da produção mundial de suínos, 60% concentra-se nos países em desenvolvimento e o restante nos países desenvolvidos. Apenas o continente asiático detém 60,3% do plantel mundial (EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA, 2001), do qual a China mantém o maior rebanho, com 422,56 milhões de cabeças no ano de 1999 (FAO, 2000). Avalia-se que a produção nestes países venha a obter um incremento frente às restrições impostas pela comunidade europeia diante dos problemas ambientais e sanitários, o que deve favorecer a exportação de carne suína. Portanto, países detentores de uma suinocultura competitiva e com condições sanitárias adequadas serão promissores no mercado.

Estima-se que a produção de carne suína aumenta 6% ao ano no Brasil, detentor de um plantel de 36,5 milhões de cabeças e 2,2 milhões de matrizes no ano de 2000, o que o coloca como o quarto maior rebanho (EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA, 2001) e sétimo produtor de carne suína, com 1,75 milhões de toneladas em 1999 (FAO, 2000). A adaptação da indústria suinícola no país pode ser entendida pelas características de

grandes áreas territoriais e ao clima predominantemente tropical, os quais favorecem a obtenção de grãos. As regiões Sul e Sudeste concentram a produção de suínos, com 40% do plantel brasileiro; observando-se incremento da atividade na região Centro-Oeste (GOMES, 1993; CANEVER & SANTOS FILHO, 1999).

A cadeia produtiva da suinocultura brasileira representa R\$ 10 bilhões no PIB nacional (ANTUNES, 2001) e é responsável pela renda de 2,7 milhões de pessoas, das quais 733 mil dependem diretamente da atividade (EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA, 2001). Presente em quase metade das propriedades rurais do país, a suinocultura contribui para a viabilização de pequenos e médios produtores agrícolas, tradicionalmente utilizando mão-de-obra familiar; o que gera empregos e fixa o trabalhador ao campo (GOMES, 1993). Os estados da região Sul lideram o volume de produção, cuja atividade é desenvolvida na maioria por pequenas propriedades que participam de sistemas integrados, coordenados por agroindústrias ou cooperativas (BOHRER, 1993). No Rio Grande do Sul, os suínos estão presentes em 76% dos estabelecimentos rurais, dos quais 16% comercializam os animais; estando a maior parte do rebanho concentrada em propriedades com até 50 hectares (VIOLA & BARTELS, 1993).

A taxa de desfrute, correspondente à proporção de animais abatidos no rebanho, que em 1975 era de 37%, evoluiu para 61% em 1998 (MARTINS, 1999), valor este considerado baixo se comparado com os índices dos principais países produtores. Contudo, os números destes países equiparam-se aos registrados pelos estados da região Sul, especialmente Santa Catarina (GOMES, 1993).

O Brasil conta com 118 indústrias frigoríficas, responsáveis pelo abate de 24,9 milhões de suínos no ano de 2000, dos quais 19,48 milhões foram realizados sob inspeção federal. Da produção brasileira, 66% é destinada ao mercado interno, principalmente sob a forma de produtos industrializados; registrando-se no ano de 2000 um consumo *per capita* de 10,9 quilos de carne. A região Sul, livre de febre aftosa e peste suína clássica até 1999, foi responsável pela exportação de 82 mil toneladas de carne suína neste período. Já em 2000, o volume de exportações foi de 127 mil toneladas, sendo os principais compradores a Argentina, Hong Kong e Rússia;

esperando-se atingir um valor próximo a 190 mil toneladas no ano de 2001, apesar das restrições impostas pelos mercados importadores frente aos surtos de febre aftosa registrados no Rio Grande do Sul (ABIPECS, 2001).

1.2 Enfermidades do trato respiratório dos suínos.

Embora detentor de números expressivos de rebanho e produção, a indústria suinícola brasileira apresenta fatores que contribuem para torná-la pouco competitiva. GOMES (1993) destaca a necessidade de mudanças nas políticas de preços, produto e produtividade.

No aspecto sanitário, as enfermidades respiratórias podem ser consideradas um dos principais obstáculos à produção de suínos em todos os países produtores, nos quais apresentam-se endêmicas há várias décadas. Devido ao seu caráter enzoótico e as dificuldades práticas encontradas na profilaxia e combate, estas doenças tornam-se relevantes no contexto econômico da suinocultura (MADEC, 2001), sendo objeto de diversos estudos que buscam melhorar o quadro observado a campo.

As doenças respiratórias estão amplamente distribuídas nas granjas nacionais, sendo que a industrialização do sistema de produção de suínos favorece o surgimento destas, devido ao aumento do contato entre os animais. Segundo PIFFER *et alii* (1985), estas enfermidades são de origem multifatorial, cujas manifestações resultam dos agentes etiológicos e de fatores ambientais. Além do confinamento dos animais, a prevalência é também associada à introdução de animais oriundos de outras granjas; mistura freqüente de lotes de animais, principalmente quando há exposição a grupos mais velhos de suínos; e ventilação insuficiente nas instalações (STEVENSON, 1998).

Os prejuízos econômicos decorrentes de enfermidades respiratórias advêm não somente da mortalidade causada ao longo das etapas de produção, mas também pela diminuição da taxa de crescimento e conversão alimentar, gastos com medicação, e perdas ao abate, onde se consideram a condenação de carcaças ou o aproveitamento

condicional destas (HUNNEMAN, 1986; PLOMGAARD, 1999; KICH & PONTES, 2001). As perdas são evidentes principalmente no período de crescimento e terminação, quando os animais são expostos à infecção após a perda da imunidade passiva (PLOMGAARD, 1999). Portanto, as estratégias a serem adotadas durante a ocorrência destas doenças devem considerar a severidade das mesmas e estimar os prejuízos decorrentes. As medidas curativas adotadas nunca devem ultrapassar as perdas estimadas (PIFFER, 1985).

O trato respiratório dos suínos pode ser colonizado por diversos patógenos, entre bacterianos e virais. As lesões decorrentes apresentam-se de diferentes formas, atingindo tanto o trato respiratório superior quanto inferior (MADEC, 2001). As doenças bacterianas que são associadas ao surgimento de sinais clínicos e lesões respiratórias não são numerosas, destacando-se a pleuropneumonia (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), pneumonia micoplásmica (*Mycoplasma hyopneumoniae*) e a rinite atrófica (*Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*) devido à frequência e intensidade com que atingem os rebanhos (PIFFER, 1985; DESROSIERS, 1998; PLOMGAARD, 1999). Estas são de caráter enzoótico e estão amplamente distribuídas no Brasil, embora existam rebanhos livres (SOBESTIANSKY *et alii*, 1999; KICH & PONTES, 2001). Alguns agentes virais que replicam no epitélio ciliado do trato respiratório dos suínos são responsáveis por enfermidades relevantes, todavia até o momento não há registro da presença da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS) e coronavírus respiratório suíno no rebanho brasileiro, ocorrendo a doença de Aujeszky de forma esporádica (KICH & PONTES, 2001).

A maioria das espécies bacterianas que causa pneumonia em suínos é habitante normal da nasofaringe e tonsilas, sendo que quase todos os animais são carreadores de diversos potenciais patógenos do pulmão. De modo geral, as pneumonias bacterianas desenvolvem-se quando o sistema imunológico dos pulmões está prejudicado (STEVENSON, 1998).

Os efeitos das enfermidades respiratórias sobre os suínos costumam ser medidos pela avaliação das lesões ao abate (NOYES *et alii*, 1990), devendo-se considerar que alguns animais podem apresentar recuperação sem vestígios de seqüelas, porém

demonstrando prejuízo sobre o ganho médio diário de peso (PIFFER *et alii*, 1985). Ao abate, pulmões, pleura e cornetos nasais são examinados quanto à presença de lesões, determinando a ocorrência, prevalência e eficiência dos métodos de controle, bem como a presença de formas clínicas das enfermidades (KICH & PONTES, 2001).

STRAW *et alii* (1989) encontraram uma perda média de 37,4 gramas de ganho médio diário de peso para cada 10% de pulmão suíno afetado por pneumonia. Para PIFFER *et alii* (1985), a presença de pleurisia e hepatização pulmonar superior a 10% do parênquima é suficiente para o decréscimo do desenvolvimento de suínos, estimando que a associação entre estas lesões possa levar à redução de 14,7% sobre o desenvolvimento dos animais.

SOBESTIANSKY *et alii* (1999) observaram a prevalência de rinite atrófica e pneumonias em granjas comerciais da região Sul do Brasil durante o período de 1995 a 1997; identificando rinite atrófica em 42,4% dos animais e pneumonia em 42,6%. No mesmo estudo, rinite atrófica foi identificada em 98% dos estabelecimentos pesquisados, enquanto que pneumonia foi encontrada em 100% destes. A prevalência de rinite atrófica e pneumonia no Estado de Santa Catarina foi de 45,9% e 55,3%, respectivamente. Levantamento semelhante foi feito por SILVA *et alii* (2001) entre os anos de 1999 e 2000, abrangendo os principais estados brasileiros produtores de suínos. Os resultados apontam lesões de pneumonia e rinite atrófica em 75,7% e 78,1% dos animais, respectivamente; do que se conclui que há um aumento na prevalência destas enfermidades.

Estes autores ressaltam a freqüente ocorrência de enfermidades respiratórias, sugerindo que as medidas profiláticas adotadas, apesar de amplamente pesquisadas e difundidas, não vêm atingindo seu objetivo. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de contemplar esta situação, principalmente no que condiz ao desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico e medidas de prevenção. Contudo, apesar da difusão dos programas de sanidade entre os produtores, a prevalência de doenças respiratórias enzoóticas continua elevada. Em muitos rebanhos, as altas taxas de mortalidade e a manifestação dos sinais clínicos poderiam ser evitadas com o uso de medicação e medidas adequadas de manejo, porém o quadro permanece

inalterado (MADEC, 2001). São, portanto, necessários esforços não só curativos, mas principalmente preventivos, o que nem sempre vêm sendo observados.

1.3 Pleuropneumonia suína.

A pleuropneumonia suína, cujo agente etiológico é o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, é uma enfermidade largamente distribuída pelo rebanho suíno mundial, estando presente em praticamente todos os países que desenvolvem a produção de suínos (TAYLOR, 1999). O primeiro relato foi registrado em 1961, quando SHOPE (1964) descreveu um surto de doença respiratória que acometeu suínos na Argentina. Os animais apresentaram distúrbios respiratórios severos, evoluindo à morte em 24 a 48 horas após o início dos sinais clínicos. O autor isolou o agente, caracterizando-o como pertencente ao gênero *Haemophilus*, e sugeriu a denominação de *Haemophilus pleuropneumoniae*.

A freqüência com que ocorre e os prejuízos econômicos decorrentes tornam a pleuropneumonia significativa na suinocultura atual. Já na década de 70, emergiu como uma enfermidade respiratória bacteriana de suínos preocupante aos produtores e médicos veterinários (FENWICK & HENRY, 1994). A doença caracteriza-se pelo desenvolvimento de broncopneumonia necrótica e hemorrágica, com exsudação de fibrina, causando pleurisia (SEBUNYA & SAUNDERS, 1983; PIFFER *et alii*, 1987; FENWICK & HENRY, 1994). Apresenta-se normalmente de forma severa e muitas vezes fatal (SEBUNYA & SAUNDERS, 1983).

Surtos já foram descritos nos países do continente Europeu, bem como diferentes partes dos Estados Unidos, Canadá, México, América do Sul, Japão, Taiwan e Austrália (NICOLET, 1992). No Brasil, o primeiro relato de pleuropneumonia é do ano de 1981, sendo registrados vários surtos desde então. Pode-se considerar a hipótese de que o agente tenha sido introduzido no país através da importação de suínos portadores; ou

ainda que já estivesse presente no rebanho brasileiro, surgindo pelas condições de confinamento da criação (PIFFER *et alii*, 1987).

1.4 Transmissão da enfermidade.

Considerando que o agente é transmitido primariamente através de exsudatos respiratórios (STEVENSON, 1998), o sistema convencional de suinocultura, tipicamente intensivo, está associado ao surgimento da enfermidade. Fatores estressantes aos suínos, como transporte, mudanças bruscas de temperatura (SEBUNYA & SAUNDERS, 1983), alta umidade do ar e ventilação insuficiente contribuem para sua disseminação, predispondo à doença (NICOLET, 1992).

A principal forma de dispersão de *A. pleuropneumoniae* é através do ar, ocorrendo a transmissão pelo contato direto entre os animais, o que também é possível através de aerossol a curtas distâncias. O agente sobrevive por um curto período de tempo no ambiente, podendo permanecer viável por alguns dias se estiver protegido por muco ou outro tipo de material orgânico, sugerindo a transmissão através de fômites, veículos e possivelmente moscas; os quais, no entanto, têm importância secundária. Os suínos portadores constituem o meio mais freqüente de disseminação do agente ao serem introduzidos em rebanhos sem exposição prévia à enfermidade (NICOLET, 1992). O desenvolvimento da doença clínica depende de vários fatores, desde a virulência do agente, o número de organismos presentes no ambiente, a suscetibilidade imunológica dos animais, incluindo as condições do confinamento (FENWICK & HENRY, 1994).

1.4.1 Patogenia da enfermidade.

A patogenia da pleuropneumonia suína ainda não é completamente entendida, embora venha sendo extensivamente estudada. A infecção geralmente ocorre através de aerossol ou por contato, quando os suínos suscetíveis inalam um número limiar de *A. pleuropneumoniae*, e esse coloniza as tonsilas, posteriormente aderindo ao epitélio alveolar (FENWICK & HENRY, 1994; TAYLOR, 1999). *A. pleuropneumoniae* foi

encontrado associado à superfície do epitélio tonsilar após 30 minutos da inoculação, sugerindo que esta ligação provavelmente é o primeiro passo de colonização do trato respiratório. Em estágios posteriores da infecção, o agente foi encontrado associado às paredes das criptas tonsilares ou distribuído nestas, o que indica sua sobrevivência no local durante o estado de portador (CHIERS *et alii*, 1999). Sob condições experimentais, ficou comprovada a transmissão através de aerossol (SAVOYE *et alii*, 2000). O número de organismos necessário para causar doença clínica depende da virulência do sorotipo e da imunidade do animal (FENWICK & HENRY, 1994). A densidade de *A. pleuropneumoniae* nos pulmões geralmente é maior do que na traquéia ou cornetos, e sua multiplicação no parênquima pulmonar parece ser determinante para o surgimento da doença clínica (KUME *et alii*, 1983).

As lesões pulmonares decorrentes são severas, citando-se hemorragia, edema e trombose; sugerindo que a vasculatura pulmonar é o alvo inicial durante a infecção (DIDIER *et alii*, 1984). No pulmão, o agente é rapidamente fagocitado pelos macrófagos alveolares, ou adere a estes, secretando exotoxinas cuja ação é potencialmente tóxica aos macrófagos e células do epitélio alveolar, bem como células endoteliais dos capilares alveolares (TAYLOR, 1999); inibindo as defesas do organismo e permitindo estabelecer-se no hospedeiro (FREY, 1995a). A ação das exotoxinas associada à resposta inflamatória induz trombose localizada, edema, necrose isquêmica e pleurite fibrinosa (FENWICK & HENRY, 1994). A cápsula é o componente primário responsável pela proteção do agente contra a ação de células fagocitárias (INZANA, 1991; TAYLOR, 1999).

Os surtos apresentam caráter que varia de superagudo a crônico, sendo que os sinais clínicos variam de acordo com a imunidade do rebanho, as condições ambientais e o grau de exposição ao agente (NICOLET, 1992). A severidade será maior, portanto, em rebanhos sem histórico da enfermidade (SEBUNYA & SAUNDERS, 1983). Suínos de todas as idades podem ser acometidos, observando-se que leitões em crescimento pertencentes a rebanhos cronicamente infectados são os mais vulneráveis e severamente afetados. Outras categorias, como matrizes e neonatos, podem também desenvolver a forma severa da enfermidade (NICOLET, 1992; FENWICK & HENRY, 1994;

STEVENSON, 1998). A pleuropneumonia suína possivelmente acomete simultaneamente todos os animais alojados no mesmo galpão, podendo ser difundida através das instalações ou ainda permanecer restrita a uma determinada área da granja (FENWICK & HENRY, 1994). Em um surto típico da enfermidade, ocasionado por uma cepa virulenta, a morbidade pode exceder a 50%, com índices de mortalidade variando de 1 a 10% (FENWICK & HENRY, 1994). Estes valores costumam ser elevados em suínos de todas as categorias que não tiveram contato prévio com o agente (CARTER *et alii*, 1995).

1.4.2 Sinais clínicos de pleuropneumonia.

O início da enfermidade geralmente é repentino e alguns animais podem morrer sem demonstração de sinais clínicos (NICOLET, 1992). Estes se caracterizam na enfermidade superaguda pelo surgimento de um ou mais suínos doentes que podem estar no mesmo alojamento ou não, apresentando temperatura corporal em torno de 41°C, letargia, dispnéia e cianose; além da presença de exsudato espumoso e hemorrágico nas narinas e boca. Os animais podem apresentar diarréia discreta e vômito, além de falência cardíaca e circulatória; quando se observa cianose no nariz, orelhas e membros, evoluindo para toda a superfície corporal. A progressão à morte é rápida, ocorrendo em torno de 18 a 36 horas. Em neonatos, a doença cursa com septicemia, geralmente fatal (NICOLET, 1992; STEVENSON, 1998). A forma aguda pode atingir suínos confinados no mesmo ou em diferentes galpões. Os animais apresentam temperatura entre 40,5°C a 41°C (NICOLET, 1992). Insuficiência cardíaca geralmente é observada, ocasionando congestão das extremidades. A perda de condições dos animais é marcante, sendo aparente após 24 horas do início da enfermidade (TAYLOR, 1999). Os animais apresentam dispnéia e anorexia, e a doença pode evoluir para a morte (STEVENSON, 1998).

Após a resolução da fase aguda, é possível o desenvolvimento da forma subaguda ou crônica, cujos sinais clínicos são mais brandos, ocorrendo pouco ou nenhum aumento da temperatura corporal e variada intensidade de tosse espontânea ou intermitente. A

intolerância ao exercício é evidente nos suínos infectados (TAYLOR, 1999). Os animais apresentam diminuição da taxa de ganho de peso devido à perda do apetite (NICOLET, 1992). As lesões pulmonares deixam cicatrizes nestes animais, o que favorece o retardo no crescimento (STEVENSON, 1998). É possível o surgimento de complicações como artrite, endocardite e abscessos, as quais acometem um pequeno número dos animais com a doença clínica (NICOLET, 1992).

1.4.3 Lesões macroscópicas e microscópicas.

Num estudo conduzido por MORES *et alii* (1984), as lesões de pleuropneumonia mais importantes foram encontradas na cavidade torácica, envolvendo pulmões, pleura e, muitas vezes, o pericárdio. Frequentemente, em casos crônicos, desenvolvem-se nódulos delimitados por uma cápsula de tecido conjuntivo, localizados principalmente nos lobos diafragmáticos (NICOLET, 1992). Nos casos superagudos e agudos, as lesões são características, observando-se pleuropneumonia fibrino-hemorrágica e necrotizante. A distribuição das lesões geralmente é dorsal, unilateral ou lobar, podendo ser bilateral e difusa (STEVENSON, 1998).

As áreas pneumônicas são escuras e sólidas, seguidamente observando-se pleurisia fibrinosa (NICOLET, 1992). A fibrina que recobre a pleura tem aspecto escuro e granuloso quando disposta na forma de camada delgada, ou amarelo brilhante e fibrilar quando em espessa camada. O parênquima afetado encontra-se falho ou colapsado, apresentando consolidação, cuja consistência é firme e elástica, de coloração vermelho escuro se hemorrágico; ou friável se necrótico. A fibrina é também responsável pela distensão dos septos interlobulares, apresentando-se acumulada no espaço interlobular, pleural ou subpleural (STEVENSON, 1998).

Embora epistaxe não seja relatada na totalidade dos exames *ante-mortem*, descarga nasal hemorrágica é frequentemente encontrada. Brônquios e traquéia apresentam grande quantidade de exsudato espumoso de coloração avermelhada (DIDIER *et alii*, 1984). Os linfonodos bronquiais e mediastínicos apresentam-se com aumento de volume, edematosos e hiperêmicos nos casos agudos, ou ainda esbranquiçados nos casos

crônicos (MORES *et alii*, 1984). A cavidade torácica pode conter exsudato avermelhado (NICOLET, 1992).

Em muitos casos, as lesões pulmonares consolidam-se, permanecendo somente o foco de pleurisia, cuja alta prevalência ao abate sugere pleuropneumonia (NICOLET, 1992). Isso ocorre especialmente em lesões crônicas, quando a fibrose na pleura causa aderência focal ou difusa entre os pulmões e as superfícies da cavidade torácica. A presença de broncopneumonia purulenta costuma ser um indicativo de infecção bacteriana secundária (STEVENSON, 1998).

Os achados histopatológicos são mais característicos nas infecções de caráter superagudo ou agudo do que nos casos crônicos, os quais são normalmente acompanhados por infecções oportunistas que tornam as lesões diversificadas e de difícil interpretação. Estas incluem a presença de áreas pulmonares irregulares necróticas ou hemorrágicas, com infiltração de neutrófilos degenerados (STEVENSON, 1998), embora a reação inflamatória seja predominantemente mononuclear, o que sugere infecção por *A. pleuropneumoniae* (MORES *et alii*, 1984). Os vasos sanguíneos e linfáticos pulmonares apresentam severa congestão, vasculite e trombose. Os alvéolos normalmente são preenchidos por células mononucleares, predominando macrófagos, linfócitos e células do epitélio alveolar, havendo ainda a presença de fibrina, hemorragia e cocobacilos (DIDIER *et alii*, 1984).

Os animais que sobrevivem às infecções agudas ou que estão infectados de forma subclínica são os que se tornam carreadores de *A. pleuropneumoniae*, o qual permanece no trato respiratório, especialmente nas lesões necróticas do pulmão ou nas tonsilas. Nestes animais, o agente pode ainda ser encontrado na cavidade nasal, porém com menos frequência (BRANDRETH & SMITH, 1987; KUME *et alii*, 1984; NICOLET, 1992). Muitas vezes, posteriormente à infecção aguda, é estabelecido um caráter crônico e enzoótico da enfermidade, cuja baixa e constante exposição induzem imunidade ao rebanho, restringindo uma nova infecção (SEBUNYA & SAUNDERS; 1983). A introdução de um novo sorotipo de *A. pleuropneumoniae* em rebanhos cronicamente infectados normalmente resulta em baixa morbidade, e anticorpos serão detectados somente em suínos cuja nova cepa tenha sido capaz de colonizar o tecido pulmonar

(NIELSEN, 1988). A ocorrência de surtos da enfermidade é remota em rebanhos infectados de forma endêmica, onde a maioria dos animais tem um alto título de anticorpos naturalmente induzido; bem como em granjas onde as práticas de manejo e as condições ambientais são adequadas e os suínos são livres de outras doenças (FENWICK & HENRY, 1994).

Embora infecções prévias por outros patógenos não sejam necessárias para o desenvolvimento de pleuropneumonia, os sinais clínicos podem ser exacerbados por infecções anteriores ou concomitantes, geralmente causadas por *Mycoplasma spp*, *Salmonella spp*, *Pasteurella spp*, PRRS e Aujeszky (FENWICK & HENRY, 1994; TAYLOR, 1999). *Pasteurella multocida* foi isolada concomitantemente a *A. pleuropneumoniae* em 94% das infecções mistas encontradas por DIDIER *et alii* (1984). Outros isolados secundários foram identificados neste estudo como *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp*, *Salmonella choleraesuis* e *Mycoplasma spp*. FONSECA *et alii* (1999), utilizando pulmões obtidos de granjas comerciais do Rio Grande do Sul, demonstraram nestes a presença simultânea de *Mycoplasma hyopneumoniae* com *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Streptococcus spp*. α hemolíticos, demonstrando que uma enfermidade clinicamente significativa dificilmente está associada a infecções causadas por um único patógeno.

1.4.4 Diagnóstico da pleuropneumonia suína.

A história clínica e as lesões são fundamentais para o diagnóstico pressuposto de pleuropneumonia, o qual é facilitado pela suspeita de surtos agudos da enfermidade. Nestes casos, o diagnóstico final é obtido pela observação das lesões características, além do isolamento do agente. Em casos crônicos, a identificação de *A. pleuropneumoniae* é difícil (NICOLET, 1992; STEVENSON, 1998). Como diagnóstico diferencial, devem ser consideradas as infecções causadas por *Actinobacillus suis* e *Salmonella choleraesuis* ou a combinação de outros agentes como *M. hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *M. hyorhinis*; cujas lesões decorrentes são similares a pleuropneumonia (STEVENSON, 1998). Nas fases agudas e superagudas, o

diagnóstico diferencial deve considerar principalmente cólera suína, erisipela e infecções estreptocócicas. Nos casos subagudos e crônicos, as lesões pulmonares devem ser diferenciadas daquelas decorrentes de infecções por *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Fusobacterium necrophorum* (TAYLOR, 1999).

Testes sorológicos são utilizados como ferramenta diagnóstica de pleuropneumonia; todavia têm grande importância ao evidenciar a condição de imunidade do rebanho e a disseminação da infecção (NIELSEN, 1988). Para HUNNEMAN (1986), a sorologia é adequada para a identificação dos rebanhos infectados, porém suínos soronegativos pertencentes a um rebanho soropositivo devem ser considerados infectados. Convém ressaltar que nenhum teste sorológico é totalmente sensível e específico, portanto a utilização de uma combinação destes ensaios pode ser necessária para a interpretação dos resultados (NIELSEN, 1988).

NIELSEN (1988) destaca os testes de fixação do Complemento, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e aglutinação em tubo como testes sorológicos para *A. pleuropneumoniae*. O teste de fixação do Complemento já foi bastante utilizado. Sua interpretação devia considerar a história clínica do rebanho, uma vez que freqüentemente poucos animais apresentam título de anticorpos para o agente, e em rebanhos cronicamente infectados o número total de animais soropositivos pode variar consideravelmente. A aglutinação em tubo não detecta a imunidade passiva nos leitões após 4 semanas de vida, o que sugere sua utilização para a identificação de infecções recentes em animais até esta faixa de idade. Atualmente, estas provas foram substituídas pelo teste de ELISA, de execução mais rápida e simples, e bastante sensível.

A maioria dos rebanhos de países produtores de suínos é endemicamente infectada por *A. pleuropneumoniae*, apresentando-se sorologicamente positiva, porém sem demonstrar sinais clínicos da doença. Esses animais podem estar infectados por cepas pouco virulentas ou as condições de manejo do rebanho são adequadas e impedem a manifestação da doença. Alguns rebanhos podem ser sorologicamente negativos, sem evidências de doença clínica. Estes são considerados mais vulneráveis, tornando as medidas de biossegurança fundamentais (FENWICK & HENRY, 1994).

1.4.5 Terapia e profilaxia da enfermidade.

A terapia parenteral com antibióticos aplicada aos suínos afetados por pleuropneumonia geralmente é efetiva se realizada nos estágios iniciais da enfermidade, quando pode reduzir a mortalidade (DESROSIERS, 1998; TAYLOR, 1999). Muitos isolados são ainda sensíveis à penicilina, o que traz resultados satisfatórios no tratamento e tem baixo custo de utilização. O uso de medicação por via oral não é recomendado aos suínos afetados, os quais apresentam-se inapetentes (DESROSIERS, 1998). Os animais demonstram aparente recuperação clínica após a terapia; porém a infecção do rebanho não é eliminada (TAYLOR, 1999).

Para FENWICK & HENRY (1994), a ocorrência de pleuropneumonia induz a duas situações específicas, as quais envolvem a manutenção do rebanho livre da enfermidade ou a convivência com esta em baixo nível de impacto econômico; obtidas com a utilização de técnicas de manejo que buscam o controle ou a erradicação da doença. É possível manter um rebanho com nível basal de infecção, adotando medidas específicas. Estas incluem a manutenção de adequadas condições climáticas e de densidade populacional, prevenção do contato entre os leitões desmamados e as matrizes, bem como o contato entre os suínos jovens e os mais velhos. O manejo *all in, all out* torna-se, portanto, fundamental. Repetidos testes sorológicos devem ser realizados nas matrizes, pois as infecções geralmente surgem nos leitões de granjas soropositivas (HUNNEMAN, 1986). O uso de medicação ou técnicas de desmame precoce segregado pode ajudar na prevenção. Este, realizado entre 16 a 18 dias de vida dos leitões, resulta em satisfatória, ainda que incompleta, proteção contra os surtos da doença (DESROSIERS, 1998).

Embora preconizada, a erradicação não é um método unânime entre os produtores, uma vez que envolve a total substituição do plantel por suínos oriundos de rebanhos clinicamente e sorologicamente negativos para *A. pleuropneumoniae*. Além disso, o risco de novos surtos da doença não será eliminado após a substituição dos animais se medidas adequadas de manejo não forem adotadas (FENWICK & HENRY, 1994). A maioria das estratégias de erradicação combina medicação com exclusão parcial da população, além de mudanças no manejo. O insucesso na eliminação do agente é muito

comum, porém há uma significativa redução no surgimento de sinais clínicos, lesões e mortalidade (PLOMGAARD, 1999).

1.4.6 Implicações econômicas da enfermidade.

Na avaliação do desempenho econômico de uma unidade de terminação de suínos acometida por um surto de pleuropneumonia, PROTAS *et alii* (1985) encontraram um aumento de 38% quanto às despesas originadas pelo uso de medicamentos e perdas de animais, se comparado ao período anterior ao surto; salientando que este procedimento necessita de uso mais intenso de mão-de-obra, o que contribui para a elevação dos custos.

ZIZLAVSKY *et alii* implantaram um programa de vacinação e medicação em rebanhos com ocorrência de pleuropneumonia e pneumonia micoplásmica. Posteriormente, foi observado um aumento do ganho médio diário de peso nas categorias de suínos com 7 a 30 quilos, e de 30 a 110 quilos de peso corporal. Isto correspondeu a redução em 6,2 dias e 16 dias no período de terminação, respectivamente para cada categoria. A conversão alimentar foi reduzida, diminuindo o consumo em 2,5 quilos e 17,6 quilos de alimentação para cada classe animal, respectivamente. O índice de mortalidade foi reduzido de 5,9% para 2,9% após a adoção do programa. Ao mesmo tempo, foi demonstrada a redução das lesões pulmonares ao abate. Estes dados demonstram que os benefícios obtidos no período de terminação justificam o custo econômico do programa de profilaxia.

A ocorrência de pleuropneumonia com casos freqüentes de morte, seguidamente tornando-se uma enfermidade de caráter crônico no rebanho, e os prejuízos econômicos decorrentes das perdas tornam a enfermidade de especial interesse no sentido de desenvolver novos métodos que auxiliem o diagnóstico, e favoreçam, desta forma, a prevenção.

1.5 Bactérias NAD-dependente isoladas do trato respiratório de suínos.

Os membros da família *Pasteurellaceae* dependentes do fator V ou NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) presentes no trato respiratório superior dos suínos são espécies que têm importância como patógenos ou apenas constituem-se habitantes normalmente isolados de animais saudáveis. Estes organismos são *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus porcicus* e *Actinobacillus indolicus*. Os três últimos eram anteriormente conhecidos como *Minor group*; taxons D e E; e taxon F, respectivamente; sendo reclassificados após análises de comparação DNA-DNA e análise dos genes que codificam para rDNA 16S (MOLLER *et alii*, 1996). Estas espécies pertencem à microflora normal dos suínos; contudo *A. pleuropneumoniae* nem sempre é isolado de animais saudáveis (MOLLER & KILIAN, 1990).

Haemophilus parasuis, embora mais conhecido por ser o agente etiológico da doença de Glässer, é geralmente isolado da cavidade nasal de suínos clinicamente saudáveis, embora não seja encontrado em pulmões saudáveis; sendo considerado um patógeno oportunista do pulmão (STEVENSON, 1998). É diferenciado de *A. pleuropneumoniae* principalmente por não ser hemolítico, sendo negativo para a produção de urease e positivo para a presença de catalase; além de diferenças quanto à fermentação de glicídeos (KIELSTEIN *et alii*, 2001).

A participação de *Actinobacillus minor* na etiologia de pneumonias suínas não está bem esclarecida, embora esteja presente em pulmões com lesões de pneumonia ou sem lesões aparentes (RAPP *et alii*, 1985). MOLLER & KILIAN (1990) identificaram o organismo constituindo 20% da flora residente do trato respiratório de suínos saudáveis, estando também presente nas tonsilas e mucosas da boca e língua. *A. minor* colonizou persistentemente as tonsilas de suínos gnotobióticos inoculados por via intranasal, contudo estes animais não apresentaram alterações macroscópicas ou histológicas nos órgãos torácicos examinados na necropsia (BRANDRETH & SMITH, 1986). O agente apresenta-se como um organismo não hemolítico, positivo para a produção de urease e negativo para a produção de indol. Possui capacidade de fermentar glicose, manose,

maltose, sacarose e rafinose, porém não fermenta arabinose, inulina, esculina, manitol, sorbitol e inositol (MOLLER *et alii*, 1996). A alta prevalência de *H. parasuis* e *A. minor* em lesões pulmonares crônicas sugere seu envolvimento em pneumonias crônicas de suínos, possivelmente interagindo com *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (PIJOAN *et alii*, 1983).

Actinobacillus porcinus é um organismo não-hemolítico, negativo para a produção de urease, presença de catalase e produção de indol. A fermentação da maioria dos glicídeos é variável, porém não fermenta inulina, esculina e salicina (MOLLER *et alii*, 1996). A espécie *Actinobacillus indolicus* não é hemolítica, sendo negativa para a formação de urease, positiva para a presença de catalase e produção de indol. Fermenta galactose, glicose, manose, maltose e sacarose, não fermentando arabinose, inulina, esculina, salicina, manitol, sorbitol e inositol (MOLLER *et alii*, 1996). A incapacidade de degradar uréia questiona a classificação das espécies *porcinus* e *indolicus* no gênero *Actinobacillus* (KIELSTEIN *et alii*, 2001).

O isolamento de *A. minor*, *A. porcinus* e *A. indolicus* em culturas puras obtidas de lesões de pneumonia levanta questões quanto ao seu papel de agentes unicamente colonizadores do trato respiratório suíno (KIELSTEIN *et alii*, 2001). Procurando investigar a patogenicidade destas espécies, CHIERS *et alii* (2001) infectaram suínos gnotobióticos com estas, através da via oral ou intranasal. Sinais clínicos e alterações nos pulmões e pleura não foram observados nos animais, exceto um leitão infectado com *A. porcinus*, o qual apresentou ataxia. O agente foi isolado do cérebro e dos cornetos deste animal. Dos demais suínos, foi isolado *A. minor* das tonsilas de um animal, *A. indolicus* das tonsilas de dois suínos, e *A. porcinus* das tonsilas de um leitão. Ainda que os autores não tenham investigado a presença de lesões microscópicas nestes suínos, os resultados indicaram a baixa patogenicidade destes agentes; apesar da utilização de animais mais suscetíveis a infecções.

1.6 *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

As semelhanças demonstradas pelo gênero *Haemophilus* aos gêneros *Pasteurella* e *Actinobacillus* quanto ao requerimento de NAD incentivaram estudos que pretendiam uma reavaliação taxonômica de espécies pertencentes ao primeiro gênero. Inicialmente identificado como *Haemophilus pleuropneumoniae*, *A. pleuropneumoniae* foi transferido ao gênero *Actinobacillus*, devido aos estudos de homologia de DNA demonstrarem sua estreita relação com a espécie *Actinobacillus lignieresii* (POHL *et alii*, 1983).

Actinobacillus pleuropneumoniae é um patógeno bacteriano específico de suínos, infectando o pulmão através da rota respiratória, podendo causar pneumonia se inoculado no interior da traquéia de animais suscetíveis. Os fatores de virulência de que dispõem permitem-no superar as defesas naturais do pulmão (STEVENSON, 1998).

Os suínos são hospedeiros específicos, possivelmente pela capacidade do agente em obter ferro apenas da transferrina suína, e por fatores específicos de aderência (INZANA, 1991). Uma cepa isolada de artrite em cordeiro mostrou-se capaz de induzir experimentalmente lesões de pneumonia em suínos, as quais não puderam ser distinguidas daquelas causadas por isolados de suínos (BIBERSTEIN *et alii*, 1977). O isolamento de *A. pleuropneumoniae* entre os agentes causadores de otite média e interna em um leitão desmamado sugere uma nova patogenia para o agente (DUFF *et alii*, 1996).

1.6.1 Sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

A. pleuropneumoniae possui 2 biotipos, determinados pelo requerimento de NAD para o crescimento. O biotipo 1 é NAD-dependente, enquanto que os organismos NAD-independentes são descritos como biotipo 2. Este último foi anteriormente descrito como *Pasteurella haemolytica*-like (TAYLOR, 1999).

O biotipo 1 possui 12 sorotipos, sendo todos potencialmente patogênicos, ainda que existam diferenças quanto à virulência de cada um; e o biotipo 2 possui 3 sorotipos

(TAYLOR, 1999). Este é menos patogênico se comparado com as cepas NAD-dependente, sendo isolado somente nos casos severos da enfermidade; porém é capaz de induzir enfermidade superaguda e morte (DOM & HAESEBROUCK; 1992). Contudo, não é possível diferenciar os biotipos quanto às lesões encontradas nos pulmões (KIELSTEIN *et alii*, 2001). Os sorotipos do biotipo 2 foram caracterizados pelos testes de hemaglutinação indireta e difusão em gel, e demonstraram possuir pelo menos dois antígenos de superfície. Reações cruzadas não foram relatadas entre estes sorotipos (FODOR *et alii*, 1989).

A determinação do sorotipo é baseada nas diferenças dos antígenos capsulares (TIMONEY *et alii*, 1992; FENWICK & HENRY, 1994; CARTER *et alii*, 1995). Os sorotipos 1, 9 e 11; sorotipos 3, 6 e 8 e sorotipos 4 e 7 apresentam similaridade estrutural ou cadeias O de lipopolissacarídeos idênticas, o que é responsável por reações cruzadas entre estas cepas (INZANA & MATHISON, 1987; PERRY *et alii*, 1990).

A descrição dos sorotipos 1, 2 e 3 foi realizada por NICOLET (1971), enquanto que os sorotipos 4, 5 e 6 por GUNNARSON *et alii* (1977). O sorotipo 7 foi descrito por ROSENDAL & BOYD (1982), sorotipo 8 por NIELSEN & O'CONNOR (1983); sorotipos 9 e 10 por NIELSEN (1985), e sorotipos 11 e 12 por NIELSEN (1986b). Posteriormente, o sorotipo 5 foi subdividido em 5a e 5b por NIELSEN (1986a).

A distribuição dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* difere entre regiões, observando-se que em muitos países somente um sorotipo está presente, enquanto que em outros ocorrem vários sorotipos (NIELSEN, 1988). A importância epidemiológica dos sorotipos pode divergir entre países, pois algumas cepas mostram-se com baixa virulência em determinados continentes, ao passo que podem ser epidêmicas em outros (NICOLET, 1992). No Canadá, o sorotipo 1 é predominante, enquanto que o sorotipo 2 é o mais prevalente na Suíça e Dinamarca (NIELSEN, 1988). Na Suécia e Suíça já foi isolado o sorotipo 3, o qual é prevalente na Inglaterra (BRANDRETH & SMITH, 1987). O sorotipo 4 foi identificado na Inglaterra, Estados Unidos e Suécia, enquanto que o sorotipo 5 foi isolado nos Estados Unidos, Canadá, Taiwan, Bélgica e Finlândia (GUNNARSSON, 1979). Na Austrália, o sorotipo 1 foi o mais comumente isolado, seguido dos sorotipos 7, 5, 2, 3, 11 e 12 (BLACKALL & PAHOFF, 1995).

No Brasil foram isolados os sorotipos 5 e 7 entre os anos de 1981 a 1985; os sorotipos 3, 5 e 7 entre 1986 a 1989; e os sorotipos 1, 3, 5, 7 e 9 no período de 1990 a 1993. No Rio Grande do Sul foram identificados os sorotipos 5 e 7, e em Santa Catarina os sorotipos 3, 5 e 7 (PIFFER *et alii*, 1997). Em Minas Gerais foram isolados os sorotipos 1, 3, 6 e 8; dos quais o 6 e 3 foram mais prevalentes (COSTA *et alii*, 1999). Recentemente, o sorotipo 12 foi identificado pela primeira vez no país (KICH *et alii*, 2000).

1.6.2 Caracterização fenotípica de *A. pleuropneumoniae*.

As espécies do gênero *Actinobacillus* são pequenos bacilos gram-negativos, imóveis, aeróbicos, facultativamente anaeróbicos e fermentadores de glicídeos. *A. pleuropneumoniae* é um cocobacilo hemolítico (BIBERSTEIN *et alii*, 1977; INZANA, 1991; CARTER *et alii*, 1995), apresentando-se em cultura como colônias mucóides e iridescentes, com diâmetro em torno de 1 a 2 mm (SEBUNYA & SAUNDERS, 1983; TIMONEY *et alii*, 1992); cujas cepas virulentas são capsuladas. Multiplica-se rapidamente em meios acrescidos de NAD (TIMONEY *et alii*, 1992).

As características de *A. pleuropneumoniae* que permitem identificá-lo são a dependência de NAD, produção de hemólise, reação de CAMP, degradação de uréia e fermentação de glicídeos específicos (RAPP *et alii*, 1985). É caracterizado pelas provas bioquímicas de fermentação de glicose, sacarose, ribose, xilose, manitol, manose e frutose, sendo incapaz de produzir indol. Produz porfirina a partir do ácido delta-aminolevulínico (BIBERSTEIN *et alii*, 1977; MOLLER & KILIAN, 1990; TIMONEY *et alii*, 1992). BLANCHARD *et alii* (1993) descrevem variações na presença de catalase e oxidase, bem como na fermentação de lactose e xilose. O agente difere das outras espécies pela hidrólise de leucina aminopeptidase, incapacidade de degradar melibiose e ausência de hidrólise pela α -galactosidase (GUTIERREZ *et alii*, 1993).

As cepas do biotipo 2 são facilmente diferenciadas do biotipo 1 por não dependerem de NAD para a multiplicação, suas colônias são maiores em ágar sangue, no qual a hemólise apresenta-se mais forte; e multiplicam-se mais efetivamente em caldos do que em meios de cultivo sólidos (FODOR *et alii*, 1989).

O sinergismo entre as toxinas extracelulares de *A. pleuropneumoniae* e *Staphylococcus aureus* é responsável pelo fenômeno CAMP, observado quando cultivados em ágar sangue, no qual a zona de *beta* hemólise parece aumentada pela *beta* toxina de *S. aureus* (TIMONEY *et alii*, 1992; JANSEN *et alii*, 1995). Algumas amostras podem perder a capacidade hemolítica quando subcultivadas em laboratório (BIBERSTEIN *et alii*, 1977).

Divergências nos resultados das provas tradicionalmente empregadas para caracterização de *A. pleuropneumoniae* têm sido descritas. A ocorrência de amostras sorotificáveis negativas para a produção de urease foi evidenciada por RAPP *et alii* (1983); BLANCHARD *et alii*, (1993); PIFFER *et alii* (1997) e KICH *et alii* (2000). Sem a degradação de uréia, PIFFER *et alii* (1997) basearam-se na presença de hemólise, sorotificação, e o isolamento da amostra de lesões típicas da enfermidade para classificá-la como *A. pleuropneumoniae*.

Uma amostra dependente de NAD, porém negativa para a degradação de glicose, apresentou características de *A. pleuropneumoniae* e *A. minor*, sendo classificada como o primeiro pela fermentação de manitol e lactose, degradação de uréia e incapacidade de fermentar xilose. Esta amostra foi caracterizada como sorotipo 7, além de ter sido isolada de lesão característica; o que não condiz com *A. minor*, descrito como não patogênico (PIFFER *et alii*, 1997). A fermentação de glicose foi descrita por GUTIERREZ *et alii* (1993) em apenas 12,5% dos isolados de *A. pleuropneumoniae*.

Variações na presença da reação de CAMP e na produção de hemólise são também relatadas. GUTIERREZ *et alii* (1993) identificaram 80,5% dos isolados de *A. pleuropneumoniae* como positivos para o teste de CAMP. A produção de hemólise foi variável, não sendo observada em todos os isolados; o que, segundo os autores, depende diretamente da espécie animal da qual a hemácea utilizada no meio de cultivo foi obtida. GUNNARSSON *et alii* (1977) identificaram os sorotipos 1 e 5 como hemolíticos,

enquanto que os sorotipos 2, 3, 4 e 6 não apresentaram hemólise. Todas as amostras do sorotipo 5 isoladas por PIFFER *et alii* (1997) foram positivas para o teste de CAMP, enquanto que nem todos os isolados dos sorotipos 3 e 7 demonstraram essa reação; possivelmente devido à toxina ApxI, fortemente hemolítica, presente apenas no sorotipo 5. Neste mesmo estudo, foram observadas variações na hemólise de *A. pleuropneumoniae*, sendo que todos os isolados dos sorotipos 1, 5 e 9 apresentaram-se hemolíticos; enquanto que as amostras dos sorotipos 3 e 7 foram hemolíticas em 53% e 71% dos casos, respectivamente. Estes sorotipos produzem apenas a hemolisina ApxII, fracamente hemolítica, enquanto que os primeiros secretam ApxI e ApxII; possivelmente explicando os resultados encontrados. A reação de CAMP foi ainda identificada fracamente em 2 amostras identificadas como *A. minor* (RAPP *et alii*, 1985), o que pode decorrer da dificuldade em diferenciar reações fracas de negativas (KICH *et alii*, 2000).

Os resultados conflitantes da caracterização bioquímica de *A. pleuropneumoniae* são freqüentes, tornando necessário analisar os demais dados obtidos a respeito da amostra para que se possa obter uma definição segura a respeito desta. A complexidade da interpretação destes resultados sugere o emprego de técnicas independentes do fenótipo para a caracterização do agente.

1.6.3 Isolamento de *A. pleuropneumoniae*.

O isolamento de *A. pleuropneumoniae* a partir de suínos sadios ou infectados de forma subclínica muitas vezes é difícil ou não é possível, e deve-se considerar que a maioria dos rebanhos é endemicamente infectada, dos quais somente uma pequena fração contém animais com a doença clinicamente aparente (FENWICK & HENRY, 1994). Alguns animais infectados podem não ser detectados por métodos sorológicos. PIFFER *et alii* (2001) ressaltam que somente o uso deste tipo de ensaio não define a condição de infecção do animal, uma vez que *A. pleuropneumoniae* foi isolado das tonsilas de um leitão, do qual o resultado do teste de ELISA foi negativo e não havia

lesões pulmonares. Por outro lado, animais positivos para exames sorológicos podem apresentar-se clinicamente saudáveis e sem a presença de lesões, neste caso a presença da infecção é confirmada pelo isolamento do agente (JACOBSEN & NIELSEN, 1995; GAGNÉ *et alii*, 1998).

A. pleuropneumoniae é comumente isolado a partir de lesões pulmonares, muitas vezes das tonsilas, e de forma menos freqüente de outras partes do trato respiratório dos suínos (BRANDRETH & SMITH, 1987). Há descrições do isolamento obtido de suabes da cavidade nasal (KUME *et alii*, 1983; TAYLOR, 1999), faringe (GILBRIDE & ROSENDAL, 1983) e exsudatos bronquiais (TAYLOR, 1999). Utilizando animais experimentalmente infectados por *A. pleuropneumoniae*, MORES *et alii* (1984) isolaram o agente em 11 de 16 suínos inoculados, com maior freqüência nos pulmões, seguido da traquéia e tonsilas. Em casos superagudos com septicemia é possível isolar o agente de outros tratos (NICOLET, 1992).

Freqüentemente, as tentativas de isolamento através da inoculação direta no meio de cultivo são frustradas, o que em grande parte deve-se ao crescimento de organismos contaminantes, caracteristicamente habitantes normais do trato e menos fastidiosos (KUME *et alii*, 1983; PIJOAN *et alii*, 1983). O uso de meios seletivos inibe o crescimento de muitos organismos gram-positivos, porém não é tão eficiente em inibir a multiplicação de agentes gram-negativos como *P. multocida*, *Proteus* sp. e *Enterobacteriaceae*, comumente isolados (GILBRIDE & ROSENDAL, 1983; PIJOAN *et alii*, 1983; RAPP *et alii*, 1985).

Em lesões agudas de pleuropneumonia, *A. pleuropneumoniae* pode ser isolado através de semeadura direta em ágar sangue suplementado com NAD (BIBERSTEIN *et alii*, 1977). Muitas vezes não é necessário o uso de meios seletivos, devido à presença de grande número do agente nas lesões; principalmente se obtido do pulmão, o qual normalmente é livre de flora contaminante (GILBRIDE & ROSENDAL, 1983; JACOBSEN & NIELSEN, 1995). Em casos crônicos, o isolamento direto é dificultado, muitas vezes sendo negativo; o que pode não ser devido à presença do agente em pequeno número, mas sim ao efeito inibidor causado por outros agentes menos fastidiosos sobre o crescimento de *A. pleuropneumoniae* (PIJOAN *et alii*, 1983).

Métodos de isolamento seletivos e indicativos podem facilitar a identificação de *A. pleuropneumoniae* em floras bacterianas mistas. A partir de tonsilas obtidas em abatedouros, os meios de ágar sangue seletivo e ágar chocolate seletivo suplementados com 0,07% de NAD, 300 µg/ml de bacitracina, lincomicina e cristal violeta a 1 µg/ml, cada; e 50 µg/ml de nistatina foram comparados para isolamento do agente. O primeiro mostrou-se mais sensível para o isolamento de *A. pleuropneumoniae* e redução da população contaminante; porém ambos os meios de cultivo não preveniram o crescimento de *Proteus sp.*. Convém ressaltar que o meio de cultivo ágar chocolate não é indicativo para *A. pleuropneumoniae* (JACOBSEN & NIELSEN, 1995).

Procurando identificar a fonte e o método mais adequado para o isolamento bacteriológico de amostras NAD-dependente obtidas do trato respiratório superior de suínos, KICH *et alii* (2000) utilizaram suabes de secreção nasal e tonsilar, além de biópsia das tonsilas para semeadura direta em meio de cultivo sólido seletivo; diluição em caldo seletivo seguido de semeadura em meio de cultivo sólido seletivo; e diluição em caldo seletivo com posterior subsemeadura em ágar sangue. Foram analisados 117 leitões provenientes de granjas com histórico anterior positivo ou negativo para pleuropneumonia, dos quais 120 amostras NAD-dependente foram isoladas. O material obtido de biópsia tonsilar semeado diretamente em meio PPLO ágar acrescido de 2µg de cristal violeta, 10µg de NAD, 1µg de lincomicina e 1,4µg de bacitracina por ml foi mais eficiente para o isolamento. Entre as amostras isoladas, 86 foram classificadas como *A. pleuropneumoniae*.

A técnica de separação imunomagnética vem recebendo destaque no isolamento de *A. pleuropneumoniae*. GAGNÉ *et alii* (1998) avaliaram este método para o isolamento do sorotipo1 a partir das tonsilas, o qual revelou-se mais sensível do que o isolamento de cultura direta. O ensaio também é mais específico pela identificação de um sorotipo determinado, o que pode ser adaptado para o isolamento seletivo de outros sorotipos através da troca de especificidade do anticorpo empregado. Estes resultados corroboram o trabalho de PIFFER *et alii* (2001), no qual o método de isolamento tradicional foi comparado frente ao método de separação imunomagnética para identificação do sorotipo 5b de *A. pleuropneumoniae*, a partir de tonsilas. Novamente, a técnica mostrou-

se superior ao cultivo bacteriano por detectar o agente em 6 suínos de um grupo de 7. Embora o resultado bacteriológico das tonsilas tenha sido negativo por ambas as técnicas em um dos animais, foi possível isolar o agente deste a partir de um abscesso pulmonar. O isolamento de *A. pleuropneumoniae* de animais aparentemente saudáveis ou provenientes de rebanhos considerados negativos para a presença da enfermidade corroboram com a sugestão de que o agente é componente da flora normal do trato respiratório de suínos (KUME *et alii*, 1983; KICH *et alii*, 2000).

Pelas dificuldades práticas no isolamento do agente, tem sido proposto o uso de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Reação em Cadeia da Polimerase, para sua identificação (SIROIS *et alii*, 1991). A identificação de *A. pleuropneumoniae* em tonsilas através de PCR foi quase três vezes maior se comparado ao isolamento tradicional em meio de cultivo, sendo identificadas 66 e 19 tonsilas positivas, respectivamente para cada técnica, de um total de 101 tonsilas (GRAM *et alii*, 1996).

Os resultados obtidos com essa técnica motivaram sua aplicação em amostras isoladas de campo no Brasil. KLEIN (2000) desenvolveu dois ensaios de PCR, aplicados na detecção dos genes *cpx*, envolvidos no transporte da cápsula de *A. pleuropneumoniae*; e do gene *sodC*, que codifica para a enzima CuZnSOD do agente. Foram analisadas 120 amostras NAD-dependente obtidas do trato respiratório de suínos, das quais 111 confirmaram os resultados prévios de caracterização, sendo que os isolados restantes foram identificados como não sorotipificáveis, porém diferenciados de outros organismos NAD-dependente de suínos. COLLARES (2000) desenvolveu teste semelhante, no qual PCR foi utilizado para identificar os genes *A* dos operons *apxI*, *apxII* e *apxIII*, responsável por codificar as exotoxinas de *A. pleuropneumoniae*. Foram analisados 52 isolados de campo NAD-dependente previamente classificados através de sorologia; dos quais 9 foram confirmados como *A. pleuropneumoniae*, 28 como *A. minor*, e 15 como outros organismos. Estes resultados comprovam a especificidade da técnica de PCR, indicando que a mesma pode auxiliar no isolamento de *A. pleuropneumoniae*.

1.6.4 Virulência de *A. pleuropneumoniae*.

A virulência entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* é variável, porém todos são capazes de induzir a doença em suínos (HAESEBROUCK *et alii*, 1997). As cepas mais virulentas, se inoculadas numa concentração de 10^2 organismos, podem desencadear a enfermidade com alta morbidade e mortalidade (STEVENSON, 1998). Particularmente, os sorotipos 1, 5, 9 e 11 estão envolvidos nos surtos mais severos da doença, quando se associa alta mortalidade. Os sorotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 e 12, ainda que produzam lesões pulmonares semelhantes aos demais sorotipos, são geralmente menos virulentos e causam índices mais baixos de mortalidade (NICOLET, 1992).

Comparando os biotipos de *A. pleuropneumoniae*, ambos estimulam a produção de espécies ativas de oxigênio pelos macrófagos alveolares pulmonares e células polimorfonucleares, porém a resposta induzida pelo biotipo 2 é menor do que o biotipo 1. A capacidade do biotipo 1 de multiplicar-se na presença dos macrófagos, bem como combatê-los mais rápido do que o biotipo 2 sugere que o primeiro é mais virulento (DOM *et alii*, 1994). A diferença de virulência entre os biotipos foi demonstrada experimentalmente através da inoculação de 23 suínos com os sorotipos 2, 3 e 9, pertencentes ao biotipo 1. Pleuropneumonia aguda foi induzida em todos os animais, dos quais 22 morreram. Dos 9 animais inoculados com o sorotipo 2 do biotipo 2, 3 não desenvolveram sinais clínicos da enfermidade, enquanto que os suínos afetados apresentaram lesões discretas e focais de pleuropneumonia (DOM & HAESEBROUCK, 1992).

As lesões pulmonares resultantes da infecção por *A. pleuropneumoniae* devem-se aos componentes celulares do agente, os quais podem rapidamente atuar sobre o epitélio respiratório; ou ainda devido à resposta do hospedeiro a estes (FENWICK *et alii*, 1986). Sabe-se que a patogenicidade de *A. pleuropneumoniae* está relacionada a fatores do ambiente, hospedeiro e do agente infeccioso, ao qual atribuem-se diferentes fatores de virulência, que incluem exotoxinas, cápsula, lipopolissacarídeos, adesinas, proteínas ligantes da transferrina, proteínas de membrana externa e proteases (INZANA, 1991; NICOLET, 1992; HAESEBROUCK *et alii*, 1997). Estes auxiliam na evasão à resposta

imune do hospedeiro e na colonização do trato respiratório (NEGRETE-ABASCAL *et alii*, 1994).

1.6.4.1 Exotoxinas de *A. pleuropneumoniae*.

Toxinas bacterianas pertencentes à família RTX são encontradas em diversos patógenos gram-negativos pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Pasteurellaceae*. Recebem essa denominação por conterem séries repetidas de aminoácidos e caracterizam-se pela citotoxicidade dependente de cálcio; inserindo-se na membrana da célula hospedeira, na qual induz a formação de canais (KAMP *et alii*, 1991; FENWICK & HENRY, 1994; JANSEN *et alii*, 1995). *A. pleuropneumoniae* produz as toxinas ApxI, ApxII e ApxIII, codificadas por quatro genes contíguos, *C*, *A*, *B* e *D*; dispostos em operons. O produto do gene *C* está envolvido na ativação da toxina, o gene *A* codifica para a toxina, enquanto que os genes *B* e *D* codificam para proteínas envolvidas na secreção do produto (JANSEN *et alii*, 1995).

Recentemente foi descrita pela primeira vez uma quarta toxina, ApxIV; secretada por todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, porém sendo produzida somente *in vivo*. ApxIV é fracamente hemolítica e apresenta sinergismo com a toxina beta hemolítica de *Staphylococcus aureus* (SCHALLER *et alii*, 1999).

ApxI tem peso molecular aproximado de 105 kDa, sendo fortemente hemolítica e citotóxica. É produzida pelos sorotipos 1, 5, 9, 10 e 11. ApxII é uma proteína de 103 kDa, fracamente hemolítica e moderadamente citotóxica, secretada por todos os sorotipos, exceto o 10. ApxIII tem peso molecular de 120 kDa, é produzida pelos sorotipos 2, 3, 4, 6 e 8; não é hemolítica, porém é fortemente citotóxica (KAMP *et alii*, 1991). As cepas do biotipo 2 produzem somente ApxII *in vivo* e *in vitro* (DOM *et alii*, 1994).

A presença das toxinas é peculiar a cada sorotipo, que secreta uma ou até duas exotoxinas; o que os relaciona ao grau de virulência. Os sorotipos 1, 5, 9 e 11 são considerados mais virulentos pelo conjunto de toxinas produzido (KAMP *et alii*, 1991).

Para demonstrar o efeito das toxinas de *A. pleuropneumoniae* na patogenia da enfermidade, KAMP *et alii* (1997) submeteram suínos SPF à inoculação endobronquial de culturas dos sorotipos 8 (produtor de ApxII e ApxIII) ou 9 (produtor de ApxI e ApxII); culturas desprovidas das toxinas Apx; culturas desprovidas de toxinas, porém contendo as toxinas recombinantes; ou ainda a toxina recombinante inoculada isoladamente. Os animais que receberam inóculos contendo as toxinas na forma nativa ou somente recombinante demonstraram sinais clínicos da enfermidade, enquanto que os animais cujo inóculo era desprovido de toxinas apresentaram-se clinicamente saudáveis ou demonstraram sinais clínicos suaves, e lesões características foram ausentes ou muito discretas na necrópsia. As toxinas recombinantes ApxI e ApxIII induziram a doença clínica e lesões semelhantes aos animais que foram inoculados com as culturas puras, mesmo na ausência de outros componentes da cultura. A inoculação de ApxII recombinante não induziu a doença, ou os sintomas foram brandos, sugerindo que sua importância pode ser menos relevante do que ApxI e ApxIII, embora possa induzir à doença clínica. O estudo demonstra que as toxinas são essenciais para o surgimento da enfermidade clínica e das lesões características, sendo que ApxI e ApxIII; e, em menor grau, ApxII, são os principais componentes de *A. pleuropneumoniae* responsáveis pela indução da enfermidade e desenvolvimento das lesões.

JANSEN *et alii* (1995) estudaram a ação de cepas do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* destituídas dos genes que codificam para as toxinas ApxI e ou ApxII, ou dos genes *apxIBD* para secreção das toxinas, sobre neutrófilos. Estes mutantes não foram capazes de induzir lesão e morte deste tipo celular; comprovando a importância destas toxinas na evasão das defesas do hospedeiro. Através da demonstração de que a inativação dos genes *apxIBD* leva à incapacidade de secretar ApxI e ApxII, este estudo comprova ainda que os genes *apxIBD* são essenciais para a secreção da toxina ApxII, visto que este operon não possui os genes *B* e *D*.

Evidências indicam que a liberação gradual de metabólitos de *A. pleuropneumoniae* causam a estimulação dos macrófagos alveolares pulmonares. Em baixas concentrações, as toxinas estimulam o metabolismo oxidativo destas células, sem

inibição subsequente. Porém, quando em concentrações maiores, segue-se uma inibição desta atividade, e os macrófagos são combatidos (DOM *et alii*, 1992).

Suínos infectados por *A. pleuropneumoniae* produzem anticorpos contra as toxinas Apx, o que indica sua utilidade como antígenos para fins de diagnóstico (KAMP *et alii*, 1991). ApxIV, por ser antigenicamente específica e secretada por todos os sorotipos, é promissora quanto ao uso para diagnóstico ou produção de vacinas (SCHALLER *et alii*, 1999). Ao contrário das infecções naturais, as vacinas disponíveis falham na indução de anticorpos contra as toxinas (FENWICK & HENRY, 1994). Vacinas comerciais inativadas contendo ApxI, ApxII e ApxIII foram avaliadas frente ao desafio com o sorotipo 9 de *A. pleuropneumoniae*. Os sinais clínicos decorrentes da infecção permaneceram por um período de tempo mais curto nos animais imunizados comparados ao grupo controle, do mesmo modo que as lesões foram menos severas; indicando que os animais vacinados desenvolveram proteção parcial. O resultado sugere que outros componentes de *A. pleuropneumoniae* podem estar envolvidos na proteção conferida, ou ainda que altos títulos são necessários para conferir uma imunidade eficaz (CHIERS *et alii*, 1998). Embora o envolvimento das Apx seja comprovadamente essencial na patogenicidade do agente e também na imunidade, outros componentes de *A. pleuropneumoniae* são também importantes no desenvolvimento da enfermidade (HAESEBROUCK *et alii*, 1997).

Juntamente com proteases, as toxinas Apx foram identificadas no interior de vesículas de membrana existentes em *A. pleuropneumoniae*. Estas, quando liberadas ao meio, distribuem seu conteúdo. O mecanismo de secreção das proteases permanece indefinido, mas acredita-se que possam participar do dano tecidual, além de contribuir para a colonização do agente. A presença das toxinas nestas vesículas aumenta os danos teciduais decorrentes da liberação das proteases (NEGRETE-ABASCAL *et alii*, 2000).

1.6.4.2 Cápsula de *A. pleuropneumoniae*.

A cápsula é considerada um importante fator de virulência de *A. pleuropneumoniae*, devido à sua capacidade em prevenir a ativação do sistema Complemento, além de inibir a fagocitose (FENWICK & HENRY, 1994). Entretanto, seu papel na virulência e indução de imunidade não está totalmente esclarecido. O antígeno é utilizado para sorotipificação ou ensaio sorológico (INZANA & MATHISON, 1987). A composição do extrato purificado de cápsula do sorotipo 5 foi determinada, sendo um dissacarídeo de alto peso molecular, formado por 85% de hexosamina, 12% de hexose, 3% de fosfato, 0,17% de proteína, 0,20% de ácidos nucléicos e 0,01% de endotoxina (INZANA, 1987).

Na avaliação da capacidade imunogênica da cápsula, altos títulos de anticorpos foram detectados no soro de coelhos e suínos imunizados ou convalescentes de infecções experimentais, ambos desafiados com extratos totais do sorotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*, na presença de adjuvante. Contudo, a purificação de cápsula deste sorotipo produziu imunogenicidade baixa nestes animais, apesar da utilização de adjuvante, se comparada com a bactéria capsulada. Esta observação diminui seu potencial para a utilização isoladamente em vacinas; apesar de não haver relato de indução de toxicidade, sinais clínicos ou lesões de pleuropneumonia (FENWICK *et alii*, 1986; INZANA & MATHISON, 1987).

Embora a utilização de cápsula em vacinas não induza uma resposta imune satisfatória, mutantes acapsulados dos sorotipos 1 e 5 de *A. pleuropneumoniae* induziram uma forte resposta imune em suínos, sem produzir doença clínica ou lesões, com exceção de um animal que apresentou pneumonia em 35% da área pulmonar, porém a bactéria foi recuperada deste na forma acapsulada. Nestes animais, o título de anticorpos para cápsula permaneceu ausente, enquanto que os animais imunizados com bactérias capsuladas apresentaram anticorpos para estas. Não houve alterações qualitativas ou quantitativas na secreção de exotoxinas Apx pelas cepas mutantes e, tendo em vista a importância destas toxinas na indução de imunogenicidade; os mutantes acapsulados de *A. pleuropneumoniae* podem ser bons candidatos para a produção de

vacinas, protegendo os animais frente o desafio com cepas virulentas homólogas ou heterólogas (INZANA *et alii*, 1993).

1.6.4.3 Lipopolissacarídeos de *A. pleuropneumoniae*.

Lipopolissacarídeos (LPS) são os principais constituintes da membrana externa de bactérias gram-negativas, sendo compostos de polissacarídeos e lipídeo A. Este último é um componente tóxico, considerado endotoxina (HAESEBROUCK *et alii*, 1997).

Os LPS de *A. pleuropneumoniae* demonstram um padrão simples de eletroforese, resultado da constituição de polipeptídeos específicos presentes em grande quantidade. Apresentam forte atividade endotóxica, mesmo quando pequenas quantidades são administradas, o que foi demonstrado após a inoculação em suínos e coelhos, dos quais os primeiros foram mais sensíveis. A alta sensibilidade dos suínos às endotoxinas liberadas durante as infecções por *A. pleuropneumoniae* facilita sua penetração no epitélio do trato respiratório e induzem à pneumonia ou choque. A severidade das alterações costuma ser dependente da dose aplicada, porém a inoculação intrabronquial de LPS isolado de *A. pleuropneumoniae* mostrou-se mais tóxica do que a administração endovenosa (FENWICK *et alii*, 1986).

Evidências do envolvimento de LPS na patogenicidade de *A. pleuropneumoniae* foram relatadas por FENWICK *et alii* (1986), ao demonstrarem que as endotoxinas purificadas induziram lesões típicas dos estágios agudos de pleuropneumonia ao serem inoculadas pela via intrabronquial em suínos.

1.6.4.4 Proteínas de *A. pleuropneumoniae* ligantes da transferrina.

Em *A. pleuropneumoniae*, o sistema de aquisição de ferro necessário à multiplicação bacteriana é comum às espécies *Actinobacillus*, *Haemophilus* e *Pasteurella*, sendo constituído de receptores localizados em sua superfície; formados por proteínas ligantes da transferrina, denominadas Tbp 1 e Tbp 2. As proteínas de

A. pleuropneumoniae são específicas para a transferrina suína, e têm sua forma de atuação ligando-se diretamente a esta, sendo expressadas sob condições limitadas de ferro. Tbp 1 são proteínas transmembrana que atuam como canais para o transporte de ferro através da membrana, enquanto que Tbp 2 são lipoproteínas que se ancoram à membrana externa através de resíduos de ácidos graxos N-terminais. A imunização de suínos com estas proteínas confere proteção limitada frente ao desafio com cepas homólogas, o que indica que contribuem para a patogenicidade de *A. pleuropneumoniae*, porém estando outros fatores envolvidos (HAESEBROUCK *et alii*, 1997).

O gene que codifica para uma proteína ligante de transferrina (*tfbA*) do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* foi clonado por GERALD *et alii* (1992), os quais demonstraram que a seqüência de nucleotídeos deste tem 65% de identidade com a seqüência dos genes *tfbA* do sorotipo 7. A massa molecular da proteína TfbA do sorotipo 1 foi de 65 kDa, comparado com 60 kDa do sorotipo 7. As análises ainda demonstraram que os sorotipos 2, 3, 4, 8, 9, 10 e 11 codificam e expressam uma proteína TfbA altamente homóloga à expressa pelo sorotipo 7; enquanto que os sorotipos 6 e 12 expressaram proteína homóloga à TfbA encontrada no sorotipo 1. Os genes *tfbA* dos sorotipos 5a e 5b foram reconhecidos por uma sonda do sorotipo 1, porém reagiram fracamente com anticorpos obtidos contra a proteína TfbA do sorotipo 7, o que sugere que um tipo distinto de proteína TfbA está presente nestes sorotipos. Estes resultados levam a considerar a possibilidade de que variações entre estas proteínas permitam aos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae* evitar a resposta imune do hospedeiro contra cepas heterólogas.

1.6.4.5 Proteínas de membrana externa de *A. pleuropneumoniae*.

Várias proteínas de membrana externa já foram identificadas nos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. CRUZ *et alii* (1996) caracterizaram uma proteína com peso molecular de 48 kDa, identificada em todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e que está ausente em espécies gram-negativas relacionadas. Esta proteína apresentou-se

imunogênica em suínos infectados com os sorotipos 5 ou 1, sugerindo seu potencial como antígeno responsável por resposta imune cruzada.

Um anti-soro produzido em coelhos e suínos contra *A. pleuropneumoniae* reconheceu três principais proteínas de membrana externa nos sorotipos 1 a 8, os quais apresentaram peso molecular de 17 kDa, 32 kDa e 42 kDa, respectivamente. A proteína de 17 kDa foi comum a *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus lignieresii*, *Actinobacillus suis* e biotipo 2 de *A. pleuropneumoniae*; sugerindo que contém epitopo comum a vários organismos gram-negativos. As proteínas de 32 kDa e 42 kDa apresentaram epitopos comuns a alguns membros da família *Pasteurellaceae*, o que as tornam de pouco potencial para o desenvolvimento de testes de diagnóstico específicos. As proteínas de membrana externa não são, portanto, antígenos espécie ou sorotipo-específicos (MacINNES & ROSENDAL, 1987).

RAPP & ROSS (1986) identificaram anticorpos contra proteínas de membrana externa no soro de suínos infectados pelo sorotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*. O soro destes animais também reagiu com proteínas de membrana externa dos sorotipos 1 e 7, no entanto estas proteínas parecem ser tipo-específicas. Vacinas que utilizam preparações de membrana externa do sorotipo 5 de *A. pleuropneumoniae* foram capazes de induzir imunidade em suínos após o desafio com o sorotipo homólogo ou sorotipo 1, sugerindo que este antígeno pode contribuir na imunidade conferida (CRUZ *et alii*, 1996).

1.6.5 Resposta imune e imunização contra *A. pleuropneumoniae*.

As infecções naturais ou experimentais por *A. pleuropneumoniae* induzem à resposta imune, a qual é sorotipo-específica (NIELSEN, 1988). Os anticorpos presentes são IgG e IgA, sendo produzidos contra vários componentes do agente, como cápsula, LPS, exotoxinas, proteínas de membrana externa, superóxido dismutase e proteínas ligantes de ferro (HAESEBROUCK *et alii*, 1997; TAYLOR, 1999). No trato respiratório superior predomina IgA, enquanto que IgG é encontrada em maior número nos

brônquios e alvéolos, tendo importância na fixação do Complemento e adesão aos macrófagos (NEGRETE-ABASCAL *et alii*, 1994).

Anticorpos circulantes podem ser detectados em torno de 10 a 14 dias após o período de incubação, alcançando o título máximo em 3 a 4 semanas, o qual persiste em baixos níveis durante vários meses, ou desaparece após a recuperação do animal (NIELSEN, 1988; HAESBROUCK *et alii*, 1997; TAYLOR, 1999). A imunidade passiva é conferida aos leitões se a matriz foi imunizada, sendo que os anticorpos permanecem no colostro por um período entre 5 a 9 semanas, embora a proteção não perdure por mais do que 3 semanas (NICOLET, 1992). Segundo PIFFER *et alii* (1986), os anticorpos de origem materna são essenciais aos leitões até o período compreendido entre 70 e 90 dias de idade.

Os suínos que sobrevivem à infecção desenvolvem forte imunidade espécie-específica e são resistentes à reinfecção, independente do sorotipo (NICOLET, 1992), uma vez que a infecção natural com um sorotipo de *A. pleuropneumoniae* confere imunidade aos demais sorotipos (NIELSEN, 1988). Avaliando a imunidade espécie-específica, CRUIJSEN *et alii* (1995) infectaram suínos com os sorotipos 3 e 9 de *A. pleuropneumoniae* no pulmão esquerdo e, após 3 semanas, infectaram o pulmão direito destes mesmos animais com o sorotipo 9. Os animais convalescentes foram protegidos contra a reinfecção pela cepa homóloga, porém o grau de imunidade para a cepa heteróloga foi variado. O estudo comprova que existe forte imunidade sorotipo-específica, responsável por proteção completa, indicando imunidade cruzada entre sorotipos após a infecção; enquanto que não há uma adequada imunidade espécie-específica contra um sorotipo heterólogo.

A imunidade cruzada envolve outros componentes além dos anticorpos produzidos contra as exotoxinas de *A. pleuropneumoniae*. Isto foi demonstrado pela inoculação intranasal de suínos com sorotipo 2 (grupo 1), produtor de Apx II e III; sorotipo 10 (grupo 2), produtor de Apx II; e sorotipo 2 do biotipo 2 (grupo 3), o qual secreta Apx II. Todos os grupos foram subseqüentemente desafiados com o sorotipo 2 do biotipo 1. Os suínos do grupo 1 apresentaram anticorpos contra Apx II e III e, após a reinfecção; 4 de 5 animais apresentaram sinais clínicos leves ou ausentes. Nos suínos do grupo 2, foram

detectados anticorpos contra Apx I, sendo que 3 dos 5 animais demonstraram sinais clínicos moderados ou ausentes após a reinfecção. O grupo 3 produziu anticorpos contra Apx II, não desenvolvendo sinais clínicos após o desafio. A proteção conferida ao grupo 2 após o desafio não parece ser devido as Apx, pois ambas as cepas secretam um conjunto diferente de toxinas. As lesões encontradas nos animais afetados de ambos os grupos foram pequenas, e indicam que foi conferida apenas imunidade parcial. O estudo confirma a existência de proteção parcial contra o biotipo e sorotipo heterólogo, o qual não produz a mesma toxina (HAESEBROUCK *et alii*, 1996).

Vacinas inativadas para pleuropneumonia suína estão disponíveis, protegendo contra os sorotipos presentes nesta. Portanto, estudos de prevalência de sorotipos numa determinada região geográfica são fundamentais aos programas de vacinação. (BLACKALL *et alii*, 1999). Uma característica desfavorável das vacinas é a falta de proteção cruzada (DESROSIERS, 1998). A imunização não impede a colonização, infecção ou o desenvolvimento da condição de suíno carreador do agente infeccioso, porém reduz a mortalidade, os sinais clínicos e a prevalência das lesões (DESROSIERS, 1998; PLOMGAARD, 1999). Nos animais vacinados há um aumento da opsonização, e as células fagocitárias são combatidas pelo efeito das exotoxinas. Portanto, a resposta imune celular é importante na enfermidade (NEGRETE-ABASCAL *et alii*, 1994).

A vacinação com bacterinas, produzidas a partir de sorotipos de *A. pleuropneumoniae* quimicamente inativados, é utilizada na prevenção da pleuropneumonia e induz a formação de anticorpos, entretanto não confere imunidade contra os fatores secretados pelo agente durante a infecção. PIFFER *et alii* (1986) imunizaram matrizes e subsequentemente seus leitões com uma bacterina preparada com o sorotipo 5 de *A. pleuropneumoniae*. Os leitões foram posteriormente desafiados com o mesmo sorotipo; observando-se que os animais oriundos de matrizes vacinadas demonstraram menores índices de ocorrência de sinais clínicos, mortalidade e presença de lesões características de pleuropneumonia frente aos leitões de matrizes não vacinadas. O agente foi isolado em menor número da cavidade nasal destes suínos, comparado aos animais filhos de mães não vacinadas. A imunidade passiva é

importante, visto que somente a imunização dos leitões não foi suficiente para a redução dos sinais clínicos.

A imunidade conferida por um extrato livre de células, obtido do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, contendo carboidratos, endotoxina e proteína, foi avaliada frente a bacterinas disponíveis comercialmente. Foi comprovado que a proteção conferida pelo extrato foi maior do que nos animais imunizados com bacterinas. Os sinais clínicos da doença foram discretos, não ocorrendo mortes, e o percentual de lesões pulmonares foi significativamente reduzido; sugerindo que o extrato pode ser utilizado para imunização sem a adição de produtos purificados ou células inativadas. Esta preparação, contudo, não elimina o estado de suíno portador e confere imunidade apenas frente ao desafio com cepa homóloga (FEDORKA-CRAY *et alii*, 1993).

1.6.6 Sorotipificação de *A. pleuropneumoniae*.

Para a sorotipificação de *A. pleuropneumoniae*, torna-se necessário que os isolados produzam os antígenos capsulares em cultura (GRAM *et alii*, 2000). A sorotipificação é normalmente realizada através de soro-aglutinação ou teste de coaglutinação, sendo que o resultado pode ser confirmado através dos testes de difusão em gel de agarose ou hemaglutinação indireta. Estes últimos são geralmente empregados para a identificação final, no caso da ocorrência de isolados não sorotipificáveis (SEBUNYA & SAUNDERS, 1983; NICOLET, 1988; NICOLET, 1992; TIMONEY *et alii*, 1992; GUTIERREZ *et alii*, 1993).

A sorotipificação e ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos sorotipo-específicos de *A. pleuropneumoniae* costumam ser problemáticos devido ao potencial de reação cruzada dos antígenos utilizados (INZANA & MATHISON, 1987). Todos os métodos são eficientes, porém não excluem a ocorrência das reações cruzadas entre os sorotipos relacionados (MITTAL *et alii*, 1993; MOLNÁR & MOLNÁR, 1994). Para NICOLET (1988), o método mais adequado para sorotipificação é a coaglutinação. Contudo, é uma técnica inconclusiva na diferenciação entre o sorotipo 8 do 3 e 6;

sorotipo 9 do 1; e sorotipo 7 do 4. Para estes casos, sugere a identificação final através das provas de difusão em gel ou hemaglutinação indireta. PIFFER *et alii* (1987) relatam a ocorrência de amostras auto-aglutinantes, o que impede a sorotipificação; enquanto que a ocorrência de cepas não sorotipificáveis é bastante freqüente (FENWICK & HENRY, 1994).

GUTIERREZ *et alii* (1993) sorotipificaram 91,7% das 72 cepas de *A. pleuropneumoniae* analisadas, observando reação cruzada entre os sorotipos 4 e 7. GRAM *et alii* (2000) encontraram 39 cepas não sorotipificáveis de um total de 280 caracterizadas através do método de aglutinação em látex. Destas, foram sorotipificadas 27 pelos testes de imunodifusão e hemaglutinação indireta; no entanto, 12 amostras permaneceram não sorotipificáveis por reagirem com mais de um anti-soro nas três técnicas empregadas.

Entre as amostras identificadas como *A. pleuropneumoniae*, os sorotipos 1, 5 e 7 foram os únicos seguramente identificados através de aglutinação rápida em placa. Os resultados indefinidos foram decorrentes da reação cruzada entre os sorotipos 3 e 6; 9 e 10; 9 e 11; ou incapacidade de reação com os anti-soros utilizados (BLACKALL & PAHOFF, 1995). Posteriormente, estes autores utilizaram a técnica de difusão quantitativa em gel para sorotipificação. Para amostras que reagiram com mais de um anti-soro ou permaneceram não sorotipificáveis através deste método, foi usada hemaglutinação indireta. Esta, por sua vez, apresentou reação cruzada do sorotipo 6 com o anti-soro do sorotipo 8, quando testada em amostras de referência, assim como os sorotipos 9 e 11 entre si. Os resultados obtidos com os isolados de campo demonstraram que apenas 3,4% destes permaneceram não tipificáveis e 5,1% produziram reação cruzada, comprovando que o método de hemaglutinação indireta é efetivo, embora não tenha diferenciado os sorotipos 9 e 11. Estes autores sugerem uma combinação de diferentes métodos de sorotipificação para chegar ao resultado final, visto que nenhuma das técnicas utilizadas identifica os 12 sorotipos individualmente (BLACKALL *et alii*, 1999).

O conhecimento do sorotipo de *A. pleuropneumoniae* predominante numa determinada região é fundamental em estudos de epidemiologia da enfermidade, devido

a indicação da distribuição dos sorotipos e da fonte de infecção (NICOLET, 1992). Além de confirmar o diagnóstico microbiológico, a sorotipificação auxilia na seleção do teste sorológico a ser empregado, considerando-se que estes ensaios são sorotipo-específicos (NIELSEN, 1988); bem como estima a funcionalidade dos testes utilizados para monitoramento da infecção (NICOLET, 1992). Os programas de profilaxia da enfermidade necessitam da identificação dos sorotipos prevalentes e da possível introdução de novos sorotipos (HENNESSY *et alii*, 1993), ressaltando a importância no emprego das vacinas correntemente utilizadas, cuja imunidade conferida é sorotipo-específica (TIMONEY *et alii*, 1992; MITTAL *et alii*, 1993).

Devido à ocorrência de isolados de *A. pleuropneumoniae* cuja sorotipificação é imprecisa ou não é possível determinar, outras alternativas para a caracterização destas amostras são propostas. Técnicas independentes das características fenotípicas, correntemente utilizadas na tipificação do agente, podem ser uma alternativa e devem ser investigadas quanto à sua aplicabilidade. A caracterização genotípica vem sendo utilizada e pode vir a ser empregada nestes isolados.

1.7 Genotipificação de microorganismos.

Há alguns anos, as técnicas fenotípicas eram o único método disponível para a caracterização de isolados bacterianos. Embora eficientes, estas apresentam algumas dificuldades de caráter prático, usualmente a incapacidade de tipificação de algumas cepas, falta de reprodutibilidade do ensaio e baixo poder de discriminação. O desenvolvimento de técnicas moleculares trouxe inúmeros benefícios, como a aplicação na tipificação de organismos, o que abriu uma nova perspectiva para a caracterização de amostras; constituindo-se uma alternativa quando os métodos fenotípicos são falhos ou inconclusivos.

Os procedimentos moleculares utilizados para tipificação, capazes de diferenciar os indivíduos através de sua constituição de ácidos nucleicos, são conhecidos por

genotipificação, e podem empregar tanto o DNA cromossomal quanto extra-cromossomal. Estas técnicas têm suas peculiaridades e restrições, contudo apresentam algumas vantagens sobre os ensaios tradicionais, ressaltando-se a capacidade de tipificação de todas as amostras, visto que o DNA pode ser obtido de todos os organismos. Este tipo de ensaio possui maior capacidade de discriminação se comparado aos métodos fenotípicos (FARBER, 1996).

O número significativo de amostras de *A. pleuropneumoniae* que apresentam reação cruzada, são auto-aglutinantes ou não sorotipificáveis sugere a busca de métodos de caracterização independentes de características fenotípicas, como meio de confirmação nos casos em que os resultados são imprecisos (GRAM *et alii*, 2000). Técnicas moleculares podem permitir a identificação do agente e, em alguns casos, a indicação dos diferentes sorotipos (CHATELLIER *et alii*, 1999).

PCR vem sendo amplamente proposta como método de detecção de *A. pleuropneumoniae* (SIROIS *et alii*, 1991; FREY *et alii*, 1995; GRAM *et alii*, 1996; LO *et alii*, 1998; COLLARES, 2000; SAVOYE *et alii*, 2000), porém nem todos os testes são sorotipo-específicos. GRAM *et alii* (2000) desenvolveram um sistema baseado na identificação por PCR dos genes que codificam para uma lipoproteína de membrana externa (*omlA*) que permite reunir os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* em grupos. Desta forma, o grupo I incluiu os sorotipos 1, 9, 11 e 12; grupo II, sorotipos 2 e 8; grupo III, sorotipos 3, 6 e 7; grupo IV, sorotipo 4 e grupo V sorotipos 5a, 5b e 10. Para conseguir maior discriminação entre os sorotipos, o teste foi associado ao PCR para detecção dos genes ativador e estrutural das toxinas de *A. pleuropneumoniae* (*apxICA*, *apxIICA* e *apxIIICA*), desenvolvido por FREY *et alii* (1995b); porém permanecendo sem diferenciar os sorotipos 1, 9 e 11; e sorotipos 2 e 8.

A técnica de PCR foi também padronizada para a detecção dos genes que codificam para as toxinas de *A. pleuropneumoniae*, *apxAI*, *apxAII* e *apxAIII*; sendo os resultados capazes de agrupar os sorotipos conforme a produção característica de toxinas. Deste modo, a presença única do gene para a toxina I indica ser o sorotipo 10; toxinas I e II, sorotipos 1, 5a, 5b, 9 ou 11; toxinas II e III, sorotipos 2, 3, 4, 6 ou 8; e somente toxina II, sorotipos 7 ou 12 (COLLARES, 2000).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) foi utilizado para a tipificação de *A. pleuropneumoniae*, distinguindo 9 dos sorotipos de referência. Contudo, os sorotipos 1, 9 e 11 foram indiferenciados. As amostras isoladas de campo, todas do sorotipo 9, mostraram padrão de *fingerprinting* divergente da amostra de referência; provavelmente devido ao longo intervalo entre o isolamento destas. Os autores sugerem o uso da técnica como método confirmatório na caracterização de amostras que apresentam reação cruzada na sorotipificação (RYCHLÍK *et alii*, 1994).

Este mesmo ensaio foi utilizado por de la PUENTE-REDONDO *et alii* (2000) como método para diferenciação dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* após a realização de PCR para detecção dos genes que codificam para as proteínas ligadoras da transferrina, Tbp1 (*tbpA*) e Tbp2 (*tbpB*). A combinação dos resultados obtidos com a técnica sobre os produtos de PCR permitiram discriminar a maioria dos sorotipos, exceto os sorotipos 4 do 11, e 7 do 9. Os autores sugerem a diferenciação destes através da identificação por PCR do gene *apxIA*, que codifica para a toxina ApxI, proposta por BECK *et alii* (1994). A associação das técnicas de PCR e RFLP foi também utilizada para identificação do gene *aroA* que codifica para a enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetase, de *A. pleuropneumoniae*, através de PCR, com posterior tipificação por RFLP, a qual reuniu as cepas em grupo I, com os sorotipos 1, 4, 5, 9, 11 e 12; grupo 2, com sorotipos 2, 3, 6, 7 e 8; e grupo 3, com sorotipo 10 (MORAL *et alii*, 1999).

A técnica de ribotipificação utiliza sondas de ácidos nucleicos para a identificação dos genes que codificam para o RNA ribossomal, os quais estão presentes em todos os organismos procariotos e são altamente conservados (FARBER, 1996). FUSSING *et alii* (1998b) realizou a tipificação de *A. pleuropneumoniae* através deste método, aplicando-o em isolados de campo com o objetivo de investigação epidemiológica. A técnica não permitiu discriminar os sorotipos de referência 9 e 11, além dos sorotipos 5a e 5b. A ribotipificação mostrou-se um ensaio adequado para estudos da epidemiologia de *A. pleuropneumoniae*, porém deve-se considerar a utilização de outros meios para a caracterização dos sorotipos (FUSSING, 1998a).

Os estudos envolvendo o uso destes métodos moleculares na diferenciação dos diversos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* ainda não são totalmente satisfatórios, visto

que não determinam o sorotipo individualmente, necessitando de técnicas complementares para tanto. Buscando-se um ensaio com estas características, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) vem sendo avaliado neste sentido, inicialmente mostrando-se promissor devido ao custo relativamente baixo de realização e pela simplicidade de execução, se comparado às técnicas já descritas; posteriormente revelando-se adequado na caracterização da espécie (HENNESSY *et alii*, 1993). Este tipo de ensaio é desejável, viabilizando sua implantação no diagnóstico de *A. pleuropneumoniae*, para utilização como método confirmatório em amostras cuja sorotipificação permaneça indefinida.

A técnica de RAPD foi avaliada para a identificação dos sorotipos de referência de *A. pleuropneumoniae*, e com os *primers* utilizados, produziu padrões de amplificação peculiares a cada sorotipo, permitindo sua caracterização. A diferenciação dos sorotipos 1, 9 e 11; 4 e 7; 3, 6 e 8; os quais apresentam reação cruzada entre si quando submetidos aos testes tradicionais de sorotipificação, foi uma das vantagens apontadas pelo estudo. A aplicação da técnica em isolados de campo dos sorotipos 1 e 5 produziu resultados semelhantes (HENNESSY *et alii*, 1993). Estes autores sugerem a investigação da presença de plasmídeos em amostras cujo perfil apresenta-se divergente dos previamente identificados.

Por sua vez, CHATELLIER *et alii* (1999), utilizando RAPD com diferentes *primers*, procuraram estabelecer a relação entre isolados de *A. pleuropneumoniae* dos sorotipos 1 e 5 obtidos de suínos sadios e doentes. Os padrões de amplificação encontrados foram variados com cada *primer*, quando para o sorotipo 1 obtido dos animais sadios e doentes, indicando diversidade destas cepas. Isolados de um mesmo sorotipo, oriundos do mesmo rebanho, cujos padrões de RAPD mostram-se diferentes, podem sugerir que o plantel esteja infectado por diferentes cepas. Neste mesmo estudo, o sorotipo 5 apresentou um único perfil com cada *primer*. Ambos os sorotipos testados não apresentaram padrões de amplificação comuns, o que permitiu diferenciá-los.

Considerando que diferentes sorotipos devem apresentar genótipos distintos, de acordo com o *primer* utilizado, PAJU *et alii*. (1998) analisaram através de RAPD os isolados de outra espécie do gênero, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, causadora

de doença periodontal em humanos. Os autores realizaram a comparação das amostras sorotipificadas com as não sorotipificáveis, procurando a caracterização destas como algum dos padrões previamente determinados. Os resultados permitiram caracterizar as amostras estudadas como compatíveis com os padrões previamente estabelecidos para as amostras sorotipificadas; sugerindo que estes isolados tinham uma origem comum. Contudo, 12% das amostras permaneceram não sorotipificáveis. Genótipos divergentes podem indicar o surgimento de novos sorotipos do agente. Este estudo, apesar de conduzido com uma espécie diferente, sugere a aplicabilidade da técnica na caracterização das amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae*.

1.7.1 RAPD como método de genotipificação.

A técnica de PCR amplifica *in vitro* seqüências determinadas de DNA utilizando *primers* adequados que se ligam às fitas complementares, as quais são extendidas pela ação da Taq DNA polimerase. Isto possibilita a geração de grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma, o que é amplamente utilizado com diversas finalidades (TAYLOR, 1993).

Baseando-se no princípio da técnica de PCR, dois grupos independentes (WILLIAMS *et alii*, 1990; WELSH & McCLELLAND, 1990) desenvolveram quase que simultaneamente um sistema de amplificação de segmentos do DNA baseado nesta, a partir da utilização de *primers* únicos, mais curtos e com seqüência arbitrária de nucleotídeos. Esta técnica ficou popularizada como *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), conforme a denominação conferida por WILLIAMS *et alii* (1990) e criou uma nova possibilidade para a análise do genoma de indivíduos procariotos ou eucariotos.

RAPD foi idealizada para uso em mapeamento genético ou para diagnóstico, utilizando a amplificação de DNA sem necessitar do prévio conhecimento da seqüência de nucleotídeos do genoma analisado. Como suas particularidades, é um marcador dominante, cujo ensaio não é radioativo, utilizando quantidades pequenas de DNA,

como 25 ng; além de ser aplicável a muitas espécies (WILLIAMS *et alii*, 1993). Genomas de pequeno tamanho, como *Escherichia coli*, podem ser submetidos à técnica (WILLIAMS *et alii*, 1990).

Várias regiões do genoma são flanqueadas por seqüências repetidas invertidas perfeitas ou imperfeitas, que permitem ocorrer múltiplo anelamento entre o *primer* e o DNA (VENUGOPAL *et alii*, 1993). A amplificação ocorre quando duas sequências de DNA complementares ao *primer* encontram-se adjacentes em cerca de 200 a 2000 pares de bases, em orientação oposta; e a posição do *primer* está na correta direção 5'→3' na fita contrária. O resultado é a amplificação exponencial desta região, resultando num discreto segmento de DNA. Após eletroforese em gel, observam-se múltiplos segmentos de DNA amplificados, resultantes da síntese de várias porções do DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, dirigida pelo *primer* (MURALIDHARAN & WAKELAND, 1993; WILLIAMS *et alii*, 1993; FARBER, 1996).

Na comparação de indivíduos através de RAPD, muitos produtos de amplificação resultantes podem ser idênticos entre si, havendo possibilidade de amplificar segmentos únicos a um indivíduo. Este polimorfismo obtido é então utilizado como marcador molecular. O ensaio pode detectar uma única alteração no DNA genômico, uma vez que mudanças de nucleotídeos induzidas na região do *primer* produziram alteração no padrão de amplificação previamente determinado (WILLIAMS *et alii*, 1990). O polimorfismo é utilizado para a diferenciação de organismos e pode permitir a caracterização de isolados da mesma espécie (WELSH & McCLELLAND, 1990; MURALIDHARAN & WAKELAND, 1993). A acurada sensibilidade em identificar uma única troca de base no sítio de ligação do *primer* sugere a utilização da técnica na análise de indivíduos proximalmente relacionados (WILLIAMS *et alii*, 1993). A ausência do produto de amplificação pode ser devido à incapacidade de complementariedade do *primer* com o sítio de ligação, o que ocorre por mutações ou deleções destes locais ou inserções responsáveis pelo afastamento de ambos os sítios de iniciação a uma distância que a DNA polimerase não possa percorrer (MURALIDHARAN & WAKELAND, 1993; FARBER, 1996).

Os *primers* para RAPD são escolhidos aleatoriamente, porém considerando que tenham pelo menos 9 nucleotídeos de extensão, uma composição de GC mínima de 40% e ausência de seqüências palindrômicas (WILLIAMS *et alii*, 1990). A utilização de oligonucleotídeos de seqüência mais curta do que os geralmente empregados na técnica de PCR assegura a existência de muitas regiões complementares distribuídas ao acaso no DNA alvo (MURALIDHARAN & WAKELAND, 1993). Condições de baixa estringência, referentes a baixas temperaturas de anelamento e alta força iônica, aumentam a possibilidade de hibridização destes à seqüência complementar, ressaltando que os produtos de amplificação podem não ser resultados de um pareamento perfeito entre o *primer* e o DNA. Temperaturas de hibridização acima de 40°C costumam inibir os produtos de amplificação (WILLIAMS *et alii*, 1990).

Pares de oligonucleotídeos já foram utilizados em RAPD, resultando em produtos de amplificação distintos daqueles produzidos por *primers* únicos. A vantagem encontrada foi aumentar a possibilidade de obtenção de polimorfismo ao empregar diferentes associações dos mesmos *primers* (WELSH & McCLELLAND, 1991; MICHELI *et alii*, 1993; WILLIAMS *et alii*, 1993).

Tendo o objetivo de discriminar cepas de um mesmo organismo, a escolha de *primers* é um ponto crítico do ensaio. Muitas vezes são obtidos produtos de amplificação do DNA em número insuficiente ou ainda produtos comuns, em ambos os casos impedindo a diferenciação dos isolados. Esta situação é relatada por CHARLTON *et alii* (1999), que, entre 6 diferentes *primers* para RAPD utilizados, conseguiram diferenciar sete cepas de *Mycoplasma gallisepticum* com apenas um destes oligonucleotídeos empregado isoladamente ou uma associação de dois diferentes *primers* do mesmo conjunto.

O tempo de execução do ensaio é relativamente curto. Usualmente, os programas utilizados para RAPD incluem 45 ciclos, o que torna o tempo total da reação demasiadamente longo, até 5 horas. Contudo, há possibilidade de otimização, reduzido-o para 2,5 horas (YU & PAULS, 1992).

O número, a reprodutibilidade e a intensidade dos produtos de amplificação obtidos com a técnica são resultado de diversos parâmetros, os quais incluem a

concentração de sais, concentração do DNA *template*; temperatura de anelamento, pureza, tamanho, seqüência e composição do *primer* escolhido; aparelho termociclador utilizado; e procedência da DNA polimerase (WELSH & McCLELLAND, 1990; FARBER, 1996).

Considerando que o padrão dos produtos de amplificação deve-se às regiões do DNA alvo possíveis de hibridizarem ao *primer*, a preparação do DNA é um ponto crítico à reprodutibilidade da técnica. Segundo MICHELI *et alii* (1994), resíduos de etanol no DNA *template* são os principais responsáveis pela falta de reprodutibilidade da técnica.

As concentrações de DNA alvo e *primer* influenciam a reprodução do ensaio. Alguns produtos de amplificação são detectados com alta concentração de ambos, porém outros produtos obtidos com a utilização de baixas concentrações destes tornam-se de baixa intensidade ou ainda ausentes quando em altas concentrações (MURALIDHARAN & WAKELAND, 1993). Para WILLIAMS *et alii* (1993), quantidades excessivas de DNA podem resultar em arraste ou pouca definição dos produtos amplificados, ao mesmo tempo que pouca quantidade de DNA pode impedir a reprodução do padrão de RAPD. Ressalta-se, portanto, a necessidade de otimização do teste de acordo com o *primer* e o DNA alvo antes de ser empregado para a tipificação.

De forma semelhante, a concentração de íons magnésio utilizada na reação interfere na quantidade e qualidade dos produtos de amplificação obtidos por RAPD. PARK & KOHEL (1994) testaram concentrações de magnésio entre 1,5 a 6,0 mM, determinando que a concentração ótima foi específica para cada *primer* utilizado, mostrando-se, porém, independente da proporção de G/C ou A/T deste. Para a maioria dos oligonucleotídeos testados por estes autores, a concentração adequada manteve-se entre 1,5 a 4,5 mM. A concentração ótima com cada *primer* deve ser estabelecida pelo padrão consistente dos produtos de amplificação e pelo máximo polimorfismo de DNA obtido com a técnica.

Embora com o uso limitado a isolados bacterianos puros, a técnica de RAPD é promissora na tipificação de *A. pleuropneumoniae* devido aos padrões de amplificação produzidos não terem sofrido alterações após múltiplas passagens em laboratório do mesmo isolado. É possível diferenciar os sorotipos ao relacioná-los com o polimorfismo

de DNA obtido; entretanto, existe a ressalva de que o método não permite estabelecer o significado do fragmento de DNA amplificado (HENNESSY *et alii*, 1993).

1.8 Objetivos.

Muitos isolados de *A. pleuropneumoniae* são seguramente caracterizados por métodos bioquímicos e microbiológicos, contudo permanecem sem sorotipificação definida, tanto pela ocorrência de reações cruzadas entre determinados sorotipos quanto pela apresentação não sorotipificável da cepa. A parceria firmada entre a UFRGS e a Embrapa Suínos e Aves vem produzindo avanços consideráveis no estudo da pleuropneumonia suína, principalmente na área de diagnóstico molecular, quando técnicas genotípicas vêm sendo aplicadas na caracterização do agente etiológico, contornando os problemas tradicionalmente encontrados na definição fenotípica correntemente utilizada. Contudo, os isolados não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* permanecem sem caracterização, o que sugere a aplicação de ensaios alternativos que permitam uma conclusão sobre estas amostras. A técnica de RAPD vem sendo utilizada para a genotipificação de diversos gêneros bacterianos e é proposta neste estudo como método de caracterização deste tipo de amostra.

Procurando contornar esta deficiência, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

1. Padronização da técnica de RAPD em amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*.
2. Aplicação da técnica em amostras sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae* isoladas de campo no Brasil.
3. Aplicação da técnica em amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* isoladas de campo no Brasil.
4. Avaliação da aplicabilidade da técnica na caracterização genotípica de isolados sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

2.1.1 Amostras isoladas de campo

Foram utilizadas amostras de *A. pleuropneumoniae* procedentes da bacterioteca da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), isoladas entre os anos de 1981 e 2001; as quais foram previamente caracterizadas através de métodos bioquímicos e microbiológicos neste mesmo centro de pesquisa. As amostras presentes neste trabalho foram incluídas em estudos anteriores desenvolvidos em parceria entre a Embrapa Suínos e Aves, o Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, e o Centro de Biotecnologia da UFRGS; nos quais foram analisadas através de PCR quanto à presença do gene *A* dos operons *apxI*, *apxII* e *apxIII*, que codificam para as exotoxinas de *A. pleuropneumoniae* (COLLARES, 2000); e para os genes que codificam para a proteína CuZnSOD e genes *cpx* envolvidos no transporte da cápsula de *A. pleuropneumoniae* (KLEIN, 2000).

Foram analisadas 78 amostras caracterizadas como *A. pleuropneumoniae*, divididas em dois grupos distintos. O primeiro grupo era formado por 68 isolados provenientes de casos clínicos de pleuropneumonia suína, registrados em várias regiões do Brasil. Destas amostras, 49 foram sorotipificadas por PIFFER *et alii* (1997), sendo que 14 permaneceram não sorotipificáveis (Tabela 1). Este grupo recebeu a inclusão de 5 amostras isoladas e sorotipificadas pela Embrapa Suínos e Aves entre os anos de 2000 e 2001 (Tabela 2); motivo pelo qual, além da caracterização por RAPD, foi realizada somente a análise por PCR dos genes que codificam para as exotoxinas e dos genes *cpx*. Uma amostra do sorotipo 5, pertencente a este grupo, não foi caracterizada como pertencente ao subtipo 5a ou 5b.

TABELA 1. Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia

Sorotipo	Número de amostras
1	1
3	17
5	1
5a	1
5b	23
7	5
11	1
Não sorotificável	14

TABELA 2. Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia, sorotificadas nos anos de 2000 e 2001

Sorotipo	Número de amostras
1	1
4	2
7	2

O segundo grupo de amostras era constituído de isolados obtidos de tonsilas de leitões sem sinais clínicos de pleuropneumonia, com idade entre 9 a 15 semanas. Estes animais eram oriundos de seis rebanhos considerados positivos e três rebanhos considerados negativos pelo teste de ELISA polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7 de *A. pleuropneumoniae*, baseado em antígeno lipopolissacarídeo de cadeia longa (KICH, 1996). Os rebanhos localizavam-se no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Neste grupo, 16 amostras NAD-dependente eram bioquimicamente classificadas como *A. pleuropneumoniae*, das quais 4 eram sorotificáveis e 12 eram não sorotificáveis. Destas amostras não sorotificáveis, 8 foram analisadas por COSTA *et alii*¹ (2001- Informe verbal) através de PCR para a presença do gene que codifica para a exotoxina Apx IV de *A. pleuropneumoniae*, além de caracterizadas pela análise do seqüenciamento

¹ Mateus Matiuzzi da Costa. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, bloco 4, laboratório 213 (mmatiuzzi@bol.com.br).

dos genes que codificam para rDNA 16S. Estas amostras foram então reclassificadas como outros organismos NAD-dependente do trato respiratório dos suínos, não sendo incluídas no presente estudo. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador MegaBACE 1000, utilizando o *kit* para seqüenciamento DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

Portanto, o segundo grupo foi formado por isolados NAD-dependente, bioquimicamente classificados como *A. pleuropneumoniae*, hemolíticos e positivos para a degradação de uréia, conforme determinado por KICH *et alii* (2000); sendo 4 amostras sorotipificadas. Foram ainda incluídas 4 amostras não sorotipificáveis, previamente caracterizadas por técnicas fenotípicas como *A. pleuropneumoniae*, porém não analisadas quanto à presença do gene para Ap_{xIV} e não seqüenciadas (Tabela 3).

TABELA 3. Amostras NAD-dependente isoladas de rebanhos

Sorotipo	Número de amostras
7	3
12	1
Não sorotipificável	4

Todos os isolados de *A. pleuropneumoniae* utilizados neste trabalho eram pertencentes ao biotipo 1, hemolíticos e dependentes de NAD; e foram mantidos estocados em leite desnatado sob temperatura de 80°C negativos. Foram ainda incluídas as amostras 6983 e 7045, procedentes do segundo grupo, as quais foram bioquimicamente identificadas como *A. pleuropneumoniae* por KICH *et alii* (2000) e posteriormente reclassificadas como *A. indolicus* e *A. minor*, respectivamente, por COSTA *et alii* (2001- Informe verbal). A amostra 7045 não era hemolítica.

2.1.2 Amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*

Os sorotipos de referência de *A. pleuropneumoniae* foram utilizados na seleção dos *primers* para RAPD e na padronização da técnica. Foram ainda adotados como

padrão referencial do polimorfismo de DNA nos ensaios realizados com as amostras isoladas de campo sorotipificadas. As 13 amostras de referência foram obtidas da Embrapa Suínos e Aves (Tabela 4), e eram mantidas estocadas em leite desnatado sob congelamento a -80°C .

TABELA 4. Amostras de referência dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*

Sorotipo	Amostra	Referência
1	Shope 4074	ATCC 27088
2	1536	Dr. R. Ross
3	1421	Dr. R. Ross
4	M62	ATCC 33378
5a	K17	ATCC 33377
5b	L20	Dr. R. Ross
6	Femo SCI-A	Dra. R. Petersen
7	WF83 SCI-A	Dra. R. Petersen
8	F384	Dra. R. Petersen
9	F60	Dra. R. Petersen
10	13039	Dr. R. Ross
11	56153	Dr. R. Ross
12	1096	Dr. R. Ross

ATCC: *American Type Collection*

Dr. Richard Ross, Iowa University, EUA

Dra. Ruth Petersen, Intervet, Dinamarca

2.2 Meios de cultivo

Quando retiradas dos estoques, as amostras foram cultivadas em ágar sangue (Oxoid, Inglaterra) com uma estria perpendicular de *Staphylococcus aureus* durante 18 horas em ambiente de microaerofilia a 37°C . Dos organismos identificados como *A. pleuropneumoniae* pela apresentação de diâmetro entre 1 e 2 mm, hemólise, reação de CAMP e satelitismo ao *S. aureus*; foi retirada uma colônia representativa, a qual foi repicada em ágar Colúmbia (Merk, Alemanha) acrescido de 5% de soro bovino estéril e $50\ \mu\text{g/ml}$ de NAD (Sigma Chemical Co.) e multiplicadas sob as condições descritas

anteriormente. Após este período, as colônias que se apresentaram iridescentes foram utilizadas para a extração de DNA genômico.

2.3 Extração do DNA genômico

A técnica de extração de DNA empregada foi descrita por OSTAIJEN *et alii* (1997), com algumas modificações; na qual o raspado de uma placa de cultivo (60x15x21) foi ressuspensionado em 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%) 0,15M e centrifugado durante 5 minutos a 12.000g; seguido da ressuspensão em 700 µl de solução salina 0,15M e adição de proteinase K (50 µg/ml- Gibco BRL, Estados Unidos) e SDS 1,7%, permanecendo em banho de água a 65°C durante 1 hora. O extrato resultante foi submetido à purificação por volumes iguais de fenol e clorofórmio (SAMBROOK *et alii*,1989), seguido da precipitação por 0,6 volume de isopropanol e 1/10 volumes de acetato de sódio 3M, quando permaneceu a -20°C por cerca de 16 horas. O DNA resultante foi recuperado após centrifugação a 12000 x g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* lavado com etanol 70%; quando então foi ressuspensionado em TE (Tris HCl 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0), conforme descrito por SAMBROOK *et alii* (1989). O DNA total obtido foi estocado a uma temperatura de -20°C.

2.4 Oligonucleotídeos

Foram utilizados oligonucleotídeos sintéticos específicos para RAPD (Operon Technologies, CA), recomendados por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998). Os *primers* testados eram procedentes do conjunto G, composto de 20 oligonucleotídeos de seqüência diversa e aleatória, contendo 10 nucleotídeos de extensão e um conteúdo de G/C entre 60% e 70% (tabela 5).

TABELA 5. Seqüências dos *primers* utilizados

<i>Primer</i>	Seqüência
OPG-1	5'CTACGGAGGA ^{3'}
OPG-2	5'GGCACTGAGG ^{3'}
OPG-3	5'GAGCCCTCCA ^{3'}
OPG-4	5'AGCGTGTCTG ^{3'}
OPG-5	5'CTGAGACGGA ^{3'}
OPG-6	5'GTGCCTAACC ^{3'}
OPG-7	5'GAACCTGCGG ^{3'}
OPG-8	5'TCACGTCCAC ^{3'}
OPG-9	5'CTGACGTCAC ^{3'}
OPG-10	5'AGGGCCGTCT ^{3'}
OPG-11	5'TGCCCCGTCGT ^{3'}
OPG-12	5'CAGCTCACGA ^{3'}
OPG-13	5'CTCTCCGCCA ^{3'}
OPG-14	5'GGATGAGACC ^{3'}
OPG-15	5'ACTGGGACTC ^{3'}
OPG-16	5'AGCGTCCTCC ^{3'}
OPG-17	5'ACGACCGACA ^{3'}
OPG-18	5'GGCTCATGTG ^{3'}
OPG-19	5'GTCAGGGCAA ^{3'}
OPG-20	5'TCTCCCTCAG ^{3'}

2.5 Padronização da técnica de RAPD

As condições de amplificação foram sugeridas por WILLIAMS *et alii* (1990) e eram recomendadas pelo fabricante dos *primers* (Operon Technologies, CA), porém foram adotadas com algumas alterações. As reações tiveram 25µl como volume total, contendo 10mM de Tris HCl, pH 8,3; 50mM de KCl; 2,5mM de MgCl₂; 200µM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP); 2,5 unidades de Taq DNA

polimerase (Cenbiot Enzimas) e 1µl de DNA genômico. A concentração de *primer* utilizada variou entre 4,6 pmol e 9,2 pmol.

O ensaio foi realizado em termociclador (MJ Research, Inc.), e contou com uma etapa de desnaturação da dupla fita de DNA a 94°C durante 5 minutos, seguida da hibridização do *primer* com temperaturas que compreenderam 34°C, 35°C, 37°C, e 40°C durante um minuto, e da etapa de extensão a 72°C por um período de 2 minutos. Foram realizados 40 ciclos consecutivos, seguidos de uma etapa final de polimerização a 72°C por 5 minutos.

A escolha dos *primers* adequados para a diferenciação dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* foi realizada utilizando-se os sorotipos de referência 3, 4, 5a e 7. Os *primers* que diferenciaram estes sorotipos foram então utilizados sob as mesmas condições com os demais sorotipos de referência, sendo então selecionados os oligonucleotídeos que diferenciaram todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, quando foi definido o padrão de polimorfismo de DNA característico para cada cepa.

Os produtos de amplificação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/ml). Como marcador de tamanho molecular, foi utilizado DNA de λ clivado com *Hind*III e *Eco*RI, cujos fragmentos apresentavam 564, 831, 947, 1375, 1709, 1904 e 2027 pares de bases de extensão. Os resultados foram registrados em máquina fotográfica Polaroid.

2.6 Validação da técnica de RAPD

A técnica foi aplicada às amostras sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae*, utilizando o perfil de amplificação previamente obtido com as amostras padrão como referencial do polimorfismo de RAPD, com o objetivo de validá-la para caracterização das amostras não sorotipificáveis isoladas de campo, definindo os possíveis perfis de amplificação a serem esperados para as amostras não sorotipificáveis.

2.7 Aplicação da técnica na caracterização de amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae*

Os polimorfismos de DNA apresentados pelas amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* foram comparados aos previamente obtidos com as amostras sorotipificadas, procurando caracterizá-los como alguma das cepas conhecidas. Esta caracterização envolveu os dados anteriormente obtidos para as amostras não sorotipificáveis quanto à presença dos genes para as exotoxinas e transporte de cápsula de *A. pleuropneumoniae*.

2.8 Análise dos resultados

O tamanho molecular dos múltiplos segmentos de DNA amplificados pela técnica de RAPD foi determinado utilizando o programa KB, desenvolvido por SILVA² (2001–Informe verbal). A relação genética entre as amostras foi estimada através da análise dos segmentos de DNA amplificados obtidos pela técnica de RAPD, utilizando o pacote RAPDistance Programs, versão 1.04 (ARMSTRONG *et alii*, 1996). O programa é próprio para análise de padrões de polimorfismo de RAPD, e considera as relações estabelecidas por DICE (1945) e NEI & LI (1979).

A análise é realizada considerando a presença do segmento amplificado como 1, e sua ausência como 0; de modo a gerar uma matriz binária. A relação genética entre as amostras é dada pelo coeficiente de Dice, calculado através da fórmula:

$$2 \cdot n_{11} / (2 \cdot n_{11} + n_{01} + n_{10}), \text{ onde:}$$

n = número de produtos de amplificação de DNA

n_x = número de produtos de amplificação de DNA presentes na amostra x

² Sérgio Ceroni da Silva. Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, bloco 4, laboratório 213 (ceroni@dna.cbiot.ufrgs.br).

n_y = número de produtos de amplificação de DNA presentes na amostra y

n_{11} = número de produtos de amplificação de DNA nos quais $x=1$ e $y=1$

n_{00} = número de produtos de amplificação de DNA nos quais $x=0$ e $y=0$

n_{01} = número de produtos de amplificação de DNA nos quais $x=0$ e $y=1$

n_{10} = número de produtos de amplificação de DNA nos quais $x=1$ e $y=0$

$n_x = n_{11} + n_{10}$

$n_y = n_{11} + n_{01}$

O resultado da análise foi apresentado na forma de dendrograma.

3. RESULTADOS

3.1 Padronização da técnica de RAPD

3.1.1 Seleção dos *primers*

Para a diferenciação dos sorotipos 3, 4, 5a e 7, utilizados no *screening* inicial dos *primers*, foi considerada a amplificação de múltiplos produtos de DNA que puderam diferenciar estas cepas. A maioria dos *primers* para RAPD do conjunto OPG não caracterizaram estes sorotipos, com exceção do OPG-10 e OPG-19. Estes foram selecionados para o teste adicional com as demais amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*.

3.1.2 Aplicação da técnica em amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*

A técnica de RAPD foi padronizada de forma a otimizar os resultados obtidos com as amostras de referência. A temperatura de hibridização dos *primers* à fita de DNA foi definida de modo que múltiplos segmentos de DNA fossem amplificados e pudessem diferenciar os sorotipos. Esta temperatura foi estabelecida em 34°C para os *primers* OPG-10 e OPG-19. Temperaturas mais elevadas impediram a amplificação de segmentos de DNA necessários para a caracterização dos sorotipos.

A concentração de *primer* utilizada em cada reação para ambos os *primers* foi definida inicialmente em 4,6 pmol. Nas reações em que o *primer* OPG-19 foi utilizado, a concentração mais adequada foi definida em 9,2 pmol. Alterações adicionais não foram necessárias nas condições de RAPD previamente estabelecidas. Ambos os *primers* não diferenciaram os sorotipos 5a e 5b.

O polimorfismo de DNA detectado com o *primer* OPG-10 foi considerado adequado para a discriminação entre as amostras de referência (Figura 1). Com a

utilização do *primer* OPG-19, foram observados muitos produtos de amplificação comuns entre sorotipos (Figura 2).

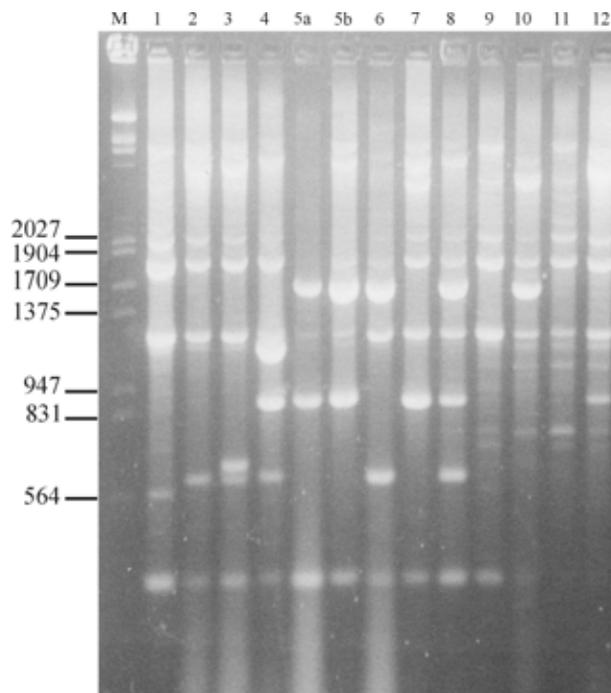


FIGURA 1- Polimorfismo de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 nas amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*

M, marcador de tamanho molecular em pares de bases ou pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1 a 12, amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*

Estes *primers* foram utilizados para a genotipificação das amostras de campo sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae*. Como segmentos de DNA capazes de diferenciar os sorotipos, foram considerados aqueles produtos de amplificação que puderam ser reproduzidos após repetições da técnica com o mesmo sorotipo.

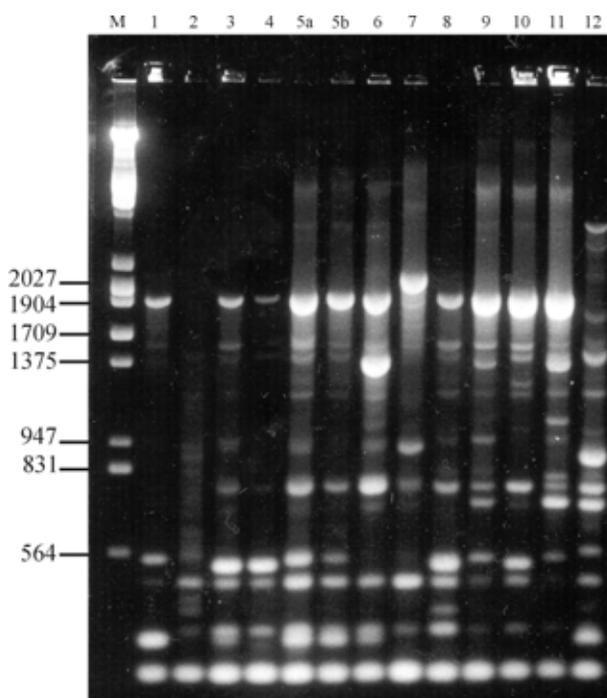


FIGURA 2- Polimorfismo de RAPD detectado pelo *primer* OPG-19 nas amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1 a 12, amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*

3.2 Aplicação da técnica de RAPD em amostras sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae* isoladas de campo

3.2.1 Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia

3.2.1.1 Resultados obtidos com o *primer* OPG-10

Nas reações em que o *primer* OPG-10 foi utilizado, cada um dos sorotipos 5, 7 e 11 apresentaram um único padrão de amplificação, o qual foi semelhante ao obtido com a respectiva amostra de referência. Contudo, o isolado de campo do sorotipo 5a apresentou polimorfismo de RAPD idêntico às amostras do sorotipo 5b, não sendo possível caracterizá-los. A amostra identificada como sorotipo 5 apresentou perfil de RAPD semelhante ao obtido com os sorotipos 5a e 5b.

Dentre os segmentos de DNA detectados pelo *primer* OPG-10 na amostra padrão do sorotipo 1, foi observada a amplificação de um produto com aproximadamente 0,50 kb, o qual não foi observado nas amostras isoladas de campo deste mesmo sorotipo (Figura 3). Embora com essa ressalva, o perfil de RAPD obtido caracterizou esta cepa.

O sorotipo 3 apresentou quatro padrões distintos de RAPD, detectados pelo *primer* OPG-10. Por sua vez, todos estes perfis foram divergentes do obtido com a amostra de referência deste sorotipo. O padrão predominante foi observado em 14 amostras, e foi semelhante ao encontrado nas amostras de campo dos sorotipos 5 com este mesmo *primer*, pela amplificação dos fragmentos com 1,60 kb; 0,90 kb e 0,40 kb. A Figura 3 apresenta o perfil de RAPD prevalente do sorotipo 3 e os produtos de amplificação obtidos pela técnica com o *primer* OPG-10 para os demais sorotipos.

Os sorotipos 3 e 5 foram diferenciados através do perfil de exotoxinas característico a cada um, previamente determinado nestas amostras através de PCR por COLLARES (2000). As exotoxinas encontradas nos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* são listadas na Tabela 6.

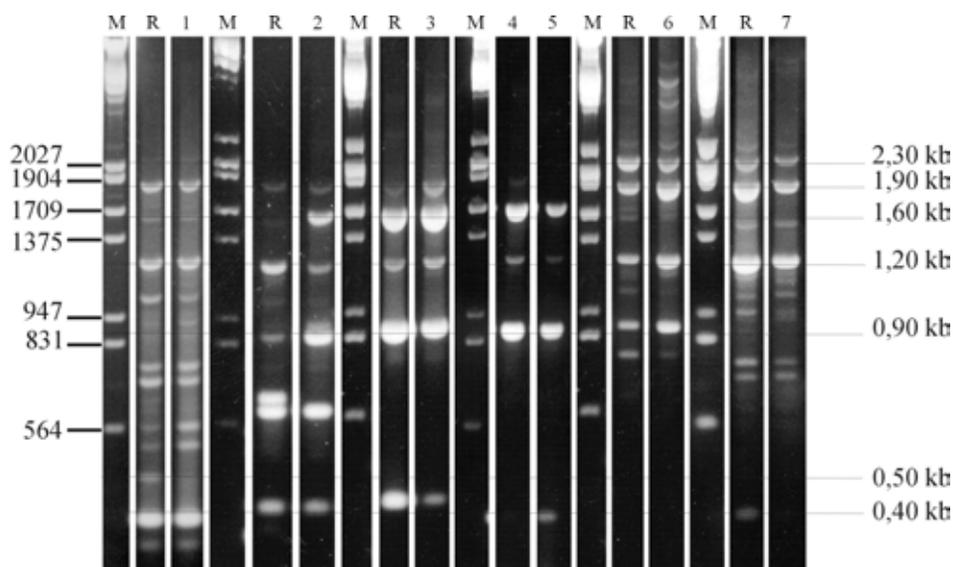


FIGURA 3- Polimorfismo de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 em diferentes sorotipos

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); R, sorotipo de referência; 1, sorotipo 1; 2, sorotipo 3; 3, sorotipo 5b; 4, sorotipo 5; 5, sorotipo 5a; 6, sorotipo 7; 7, sorotipo 11.

TABELA 6. Relação das exotoxinas ApxA secretadas pelos diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

ApxA	Sorotipo
Somente ApxIA	10
Somente ApxIIA	7 e 12
ApxIA e ApxIIA	1, 5, 9 e 11
ApxIIA e ApxIIIA	2, 3, 4, 6 e 8

Adaptado de FREY (1995a)

Os demais polimorfismos de RAPD encontrados para o sorotipo 3, utilizando o *primer* OPG-10, foram obtidos com as amostras 6742 e 6967. Estes perfis não foram observados em outros isolados de campo sorotipificados ou amostras de referência de outros sorotipos. Os produtos de RAPD obtidos para estas amostras são demonstrados na Figura 4.

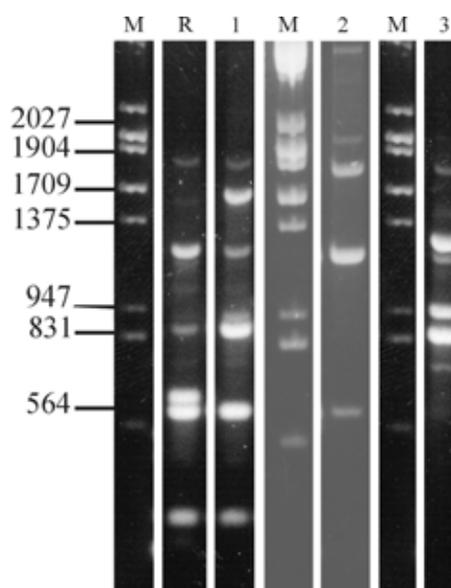


FIGURA 4- Diferentes perfis de RAPD detectados pelo *primer* OPG-10 em amostras do sorotipo 3

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); R, amostra de referência do sorotipo 3; 1, perfil predominante do sorotipo 3; 2, perfil detectado na amostra 6742; 3, perfil detectado na amostra 6967.

A amostra 6829, previamente identificada como sorotipo 3, apresentou perfil de RAPD compatível com o sorotipo 11 (Figura 5). A presença dos genes que codificam para ApxIA e ApxIIA, detectada através de PCR (Figura 6), ressalta essa observação, uma vez que o produto é secretado por cepas do sorotipo 11; diferentemente do sorotipo 3. Esta amostra foi novamente sorotipificada pela Embrapa Suínos e Aves, porém apresentou-se como não sorotipificável.

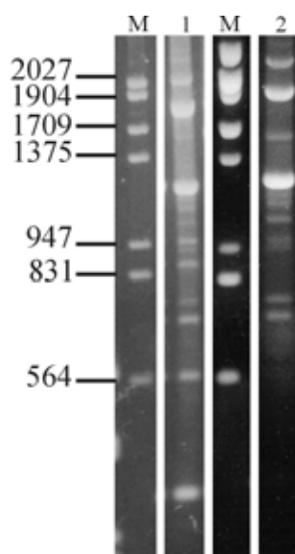


FIGURA 5- Perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 na amostra 6829 do sorotipo 3.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 6829; 2, amostra isolada de campo do sorotipo 11.

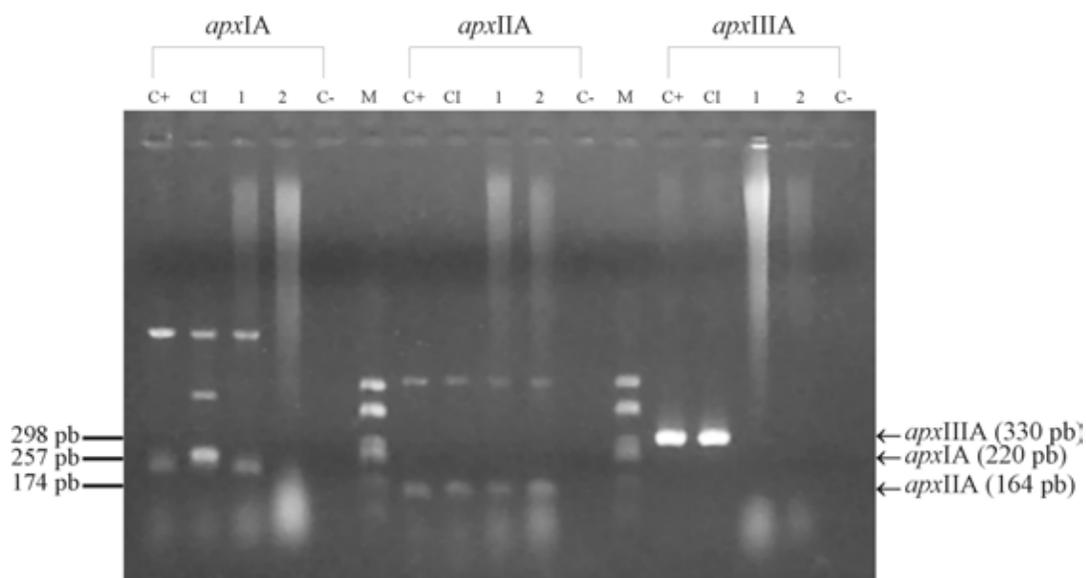


FIGURA 6- Detecção por PCR dos genes *apxIA* e *apxIIA* na amostra 6829 do sorotipo 3.

M, marcador de tamanho molecular, em pb (DNA de pUC18 clivado com *HaeIII*); C+, controle positivo da reação (reação contendo DNA do sorotipo 5b para *apxIA* e *apxIIA*, e DNA do sorotipo 3 para *apxIII A*); CI, controle interno da reação (reação contendo DNA do controle positivo diluído em 1:1000 acrescido do DNA da amostra 6829); C-, controle negativo da reação (sem acréscimo de DNA); 1 e 2, diferentes preparações de DNA da amostra 6829.

As amostras do sorotipo 4 isoladas de campo apresentaram perfil de RAPD divergente do obtido com a amostra de referência do sorotipo e semelhante ao obtido com os isolados de campo dos sorotipos 3 e 5, conforme demonstrado na Figura 7 com o *primer* OPG-10. Contudo, a presença dos genes para *Ap*xIA e *Ap*xIIA, detectada através de PCR (Figura 8), é divergente do perfil de toxinas para o sorotipo, o qual secreta *Ap*xIIA e *Ap*xIII A. Estas amostras foram ainda positivas por PCR para a presença dos genes *cpx* envolvidos no transporte de cápsula, utilizando os mesmos *primers* e condições descritos por KLEIN (2000), o que é demonstrado na Figura 9.

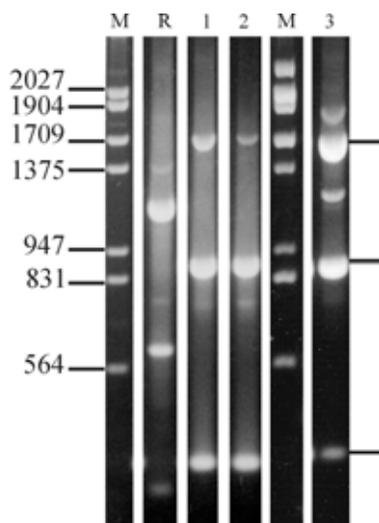


FIGURA 7- Perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 para as amostras do sorotipo 4

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); R, amostra de referência do sorotipo 4; 1 e 2, amostras sorotipificadas como 4; 3, amostra do sorotipo 5b isolada de campo.

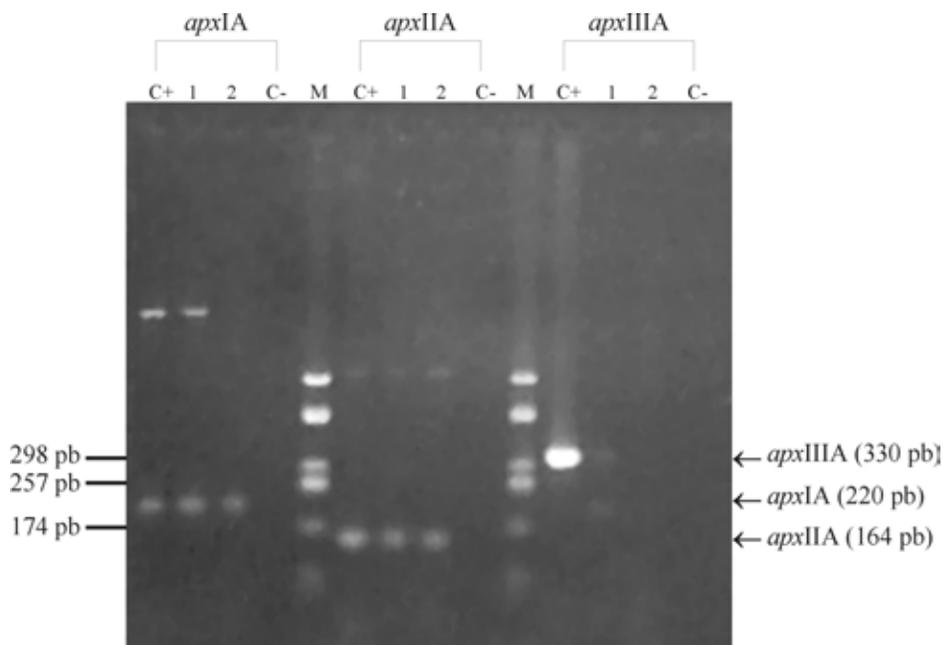


FIGURA 8- Detecção por PCR dos genes *apxIA* e *apxIIA* nas amostras de sorotipo 4 isoladas de campo.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de pUC18 clivado com *Hae*III); C+, controle positivo da reação (reação contendo DNA do sorotipo 5b para *apxIA* e *apxIIA*, e DNA do sorotipo 3 para *apxIIIA*); C-, controle negativo da reação (sem acréscimo de DNA); 1 e 2, isolados de campo do sorotipo 4.

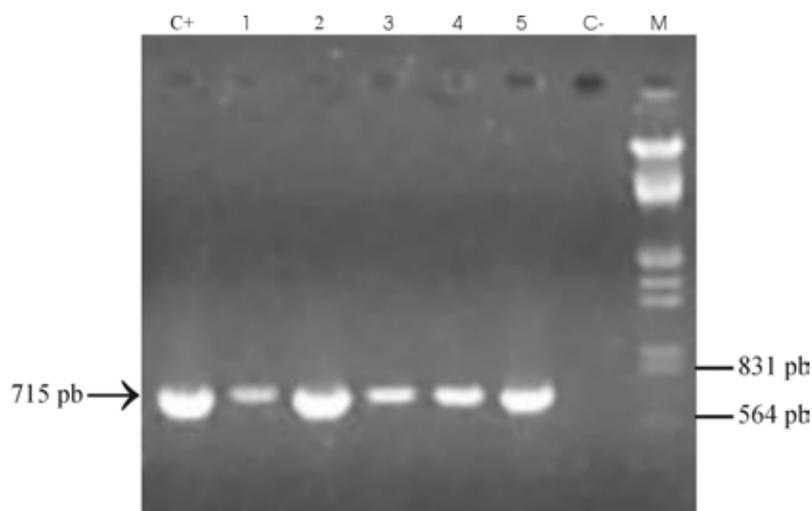


FIGURA 9- Detecção por PCR dos genes *cpx* nas amostras de sorotipo 4 isoladas de campo.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *HindIII* + *EcoRI*); C+, controle positivo da reação (reação contendo DNA do sorotipo 5b); C-, controle negativo da reação (sem acréscimo de DNA); 3 e 4, isolados de campo do sorotipo 4; 1, isolado de campo do sorotipo 1; 2 e 5, isolados de campo do sorotipo 7.

Os padrões de polimorfismo de RAPD obtidos com o *primer* OPG-10 foram assemelhados entre os sorotipos 1 e 11, os quais apresentaram como segmentos de DNA comuns os produtos em torno de 1,90 kb e 1,20 kb. Estes sorotipos foram diferenciados pela amplificação de um segmento de DNA com aproximadamente 2,30 kb, presente no sorotipo 11. Por sua vez, o sorotipo 7 apresentou perfil de amplificação distinto do encontrado para os sorotipos 3 e 5 através da amplificação de um produto com cerca de 1,90 kb presente no sorotipo 7, o qual não foi observado nos sorotipos 3 e 5. Estes apresentaram em comum um segmento em torno de 1,60 kb, ausente no sorotipo 7. A Figura 10 apresenta os segmentos de DNA amplificados que diferenciaram estes sorotipos.

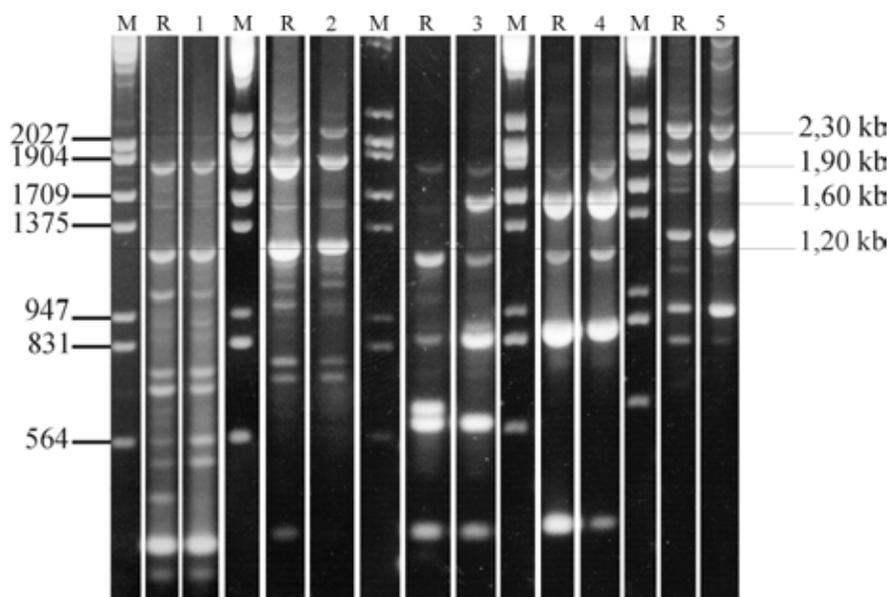


FIGURA 10- Produtos de RAPD detectados pelo *primer* OPG-10 que caracterizaram os sorotipos

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *HindIII* + *EcoRI*); R, amostra de referência do sorotipo; 1, sorotipo 1; 2, sorotipo 11; 3, sorotipo 3; 4, sorotipo 5b; 5, sorotipo 7.

3.2.1.2 Resultados obtidos com o *primer* OPG-19 em amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia

A aplicação da técnica de RAPD sobre as amostras dos sorotipos 1, 3, 5, 5a, 5b, 7 e 11 obtidas de animais com casos clínicos da enfermidade demonstrou que estes apresentaram polimorfismos de amplificação semelhantes ao obtido com as amostras de referência para o *primer* OPG-19 (Figura 11). Todavia, muitos produtos de amplificação foram semelhantes, sendo que apenas o sorotipo 7 foi distinto dos demais pela ausência de amplificação de um segmento de DNA com cerca de 0,50 kb, presente nos demais sorotipos.

A amostra 6967 do sorotipo 3, obtida de caso clínico de pleuropneumonia, foi a única deste grupo que apresentou polimorfismo de RAPD divergente do encontrado nos demais isolados deste sorotipo, utilizando o *primer* OPG-19 (Figura 12).

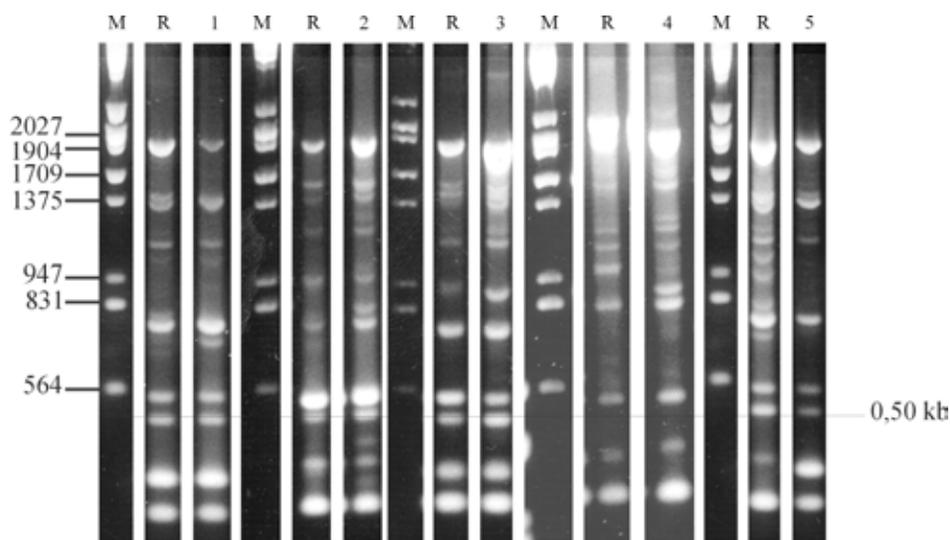


FIGURA 11- Perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-19 em isolados de casos clínicos de pleuropneumonia

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *HindIII* + *EcoRI*); R, amostra de referência do sorotipo; 1, sorotipo 1; 2, sorotipo 3; 3, sorotipo 5b; 4, sorotipo 7; 5, sorotipo 11.

3.2.2 Amostras isoladas de suínos sem sinais clínicos da enfermidade, procedentes de rebanhos

3.2.2.1 Resultados obtidos com o *primer* OPG-10

Utilizando o *primer* OPG-10, o perfil de RAPD obtido com as amostras do sorotipo 7 foi semelhante ao encontrado para o mesmo sorotipo nas amostras isoladas de animais com casos clínicos da enfermidade. Por sua vez, a aplicação da técnica com o *primer* OPG-10 no sorotipo 12 isolado de campo (Figura 13) demonstrou a ausência de amplificação de um segmento de DNA com cerca de 0,90 kb, quando comparado à respectiva amostra de referência. Este perfil de RAPD não foi encontrado em outras amostras sorotipificadas, caracterizando o sorotipo 12.

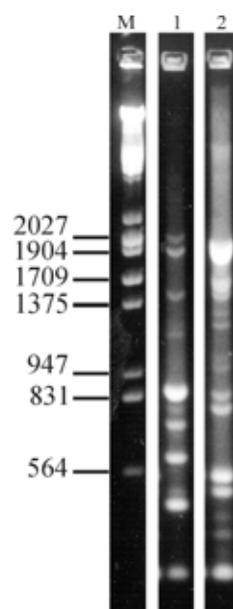


FIGURA 12- Perfil de RAPD de amostra do sorotipo 3 divergente, detectado pelo *primer* OPG-19

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 6967 do sorotipo 3; 2, amostra do sorotipo 3 demonstrando o perfil predominante detectado pelo *primer* para o sorotipo.

3.2.2.2 Resultados obtidos com o *primer* OPG-19

Os produtos de amplificação detectados através do *primer* OPG-19 para as amostras dos sorotipos 7 foram idênticos aos obtidos com este *primer* para amostras de mesmo sorotipo isoladas de suínos com casos clínicos de pleuropneumonia. Este perfil foi semelhante ao detectado para a amostra do sorotipo 12 (Figura 14), e ambos puderam ser diferenciados dos demais pela ausência de um produto de amplificação de DNA com cerca de 0,50 kb. O polimorfismo de ambos os sorotipos foi semelhante às respectivas amostras de referência.

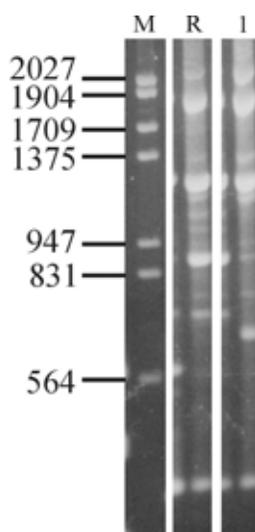


FIGURA 13- Perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 no sorotipo 12

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); R, amostra de referência do sorotipo 12; 1, amostra do sorotipo 12 isolada de campo.

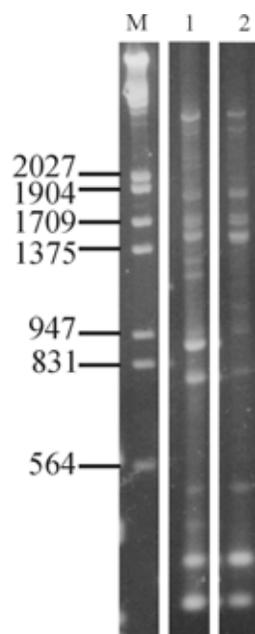


FIGURA 14- Perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-19 no sorotipo 12

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra de referência do sorotipo 12; 2, amostra do sorotipo 12 isolada de campo.

A representação esquemática dos produtos de amplificação detectados por RAPD com os *primers* OPG-10 e OPG-19 nas amostras sorotipificadas utilizadas no presente estudo é demonstrada nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Em ambas é representado o perfil predominante do sorotipo 3.



FIGURA 15- Representação esquemática da distribuição dos produtos de RAPD detectados pelo *primer* OPG-10 nos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

*Amostra ATCC do sorotipo

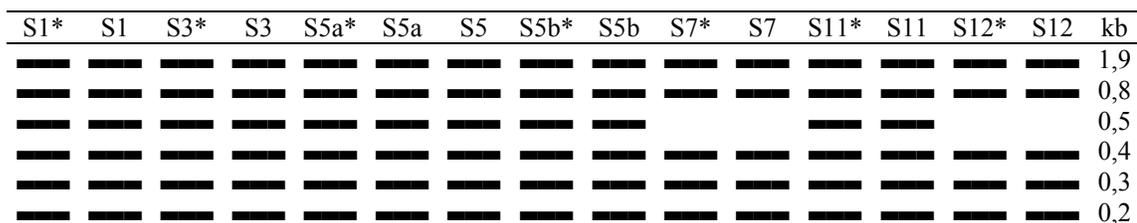


FIGURA 16- Representação esquemática da distribuição dos produtos de RAPD detectados pelo *primer* OPG-19 nos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

*Amostra ATCC do sorotipo

3.3 Aplicação da técnica de RAPD em amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae*

3.3.1 Amostras isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia

3.3.1.1 Resultados obtidos com o *primer* OPG-10

Entre os 14 isolados de campo não sorotipificáveis analisados, 13 apresentaram os padrões de amplificação de DNA já encontrados nas amostras sorotipificáveis com os *primers* OPG-10 e OPG-19. Estes perfis de RAPD foram compatíveis com aqueles obtidos com os sorotipos 3 e 5, utilizando o *primer* OPG-10. O perfil de exotoxinas destas amostras permitiu caracterizá-las como compatíveis com o sorotipo 3 (12 amostras) e sorotipo 5 (1 amostra). Alguns dos resultados obtidos com estas amostras são demonstrados na Figura 17.

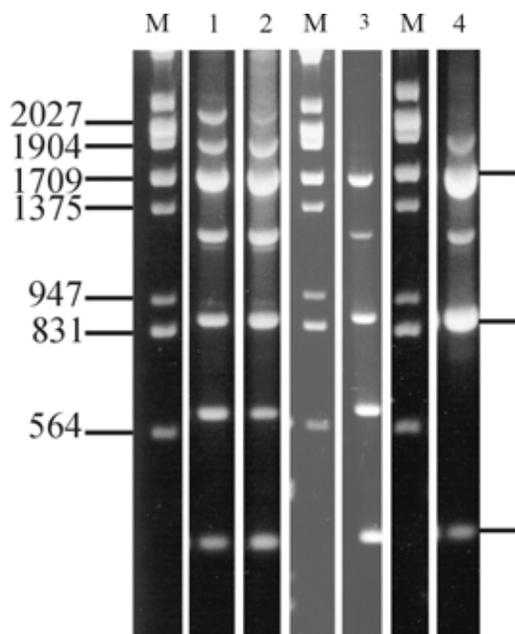


FIGURA 17- Genotipificação de amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* utilizando o *primer* OPG-10

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1 a 3, amostras não sorotipificáveis; 4, amostra do sorotipo 5b isolada de campo.

Com o *primer* OPG-10, a amostra 7300 apresentou perfil de RAPD que permitiu caracterizá-la como compatível com o sorotipo 3 (Figura 18). A amostra 6949 apresentou perfil divergente dos previamente identificados em amostras sorotipificadas ou amostras de referência, detectados com este *primer*. Contudo, o perfil demonstrado com o *primer* OPG-10 foi semelhante ao encontrado com a amostra 6967 do sorotipo 3, isolada de suíno com caso clínico de pleuropneumonia. Esta amostra apresentava os genes para ApxIIA e ApxIIIA, sendo portanto caracterizada como compatível com o sorotipo 3 (Figura 19).

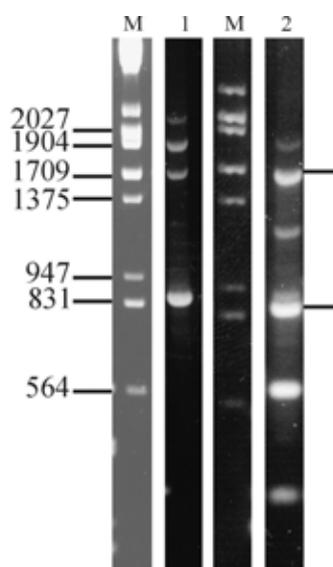


FIGURA 18- Genotipificação da amostra não sorotipificável 7300 através do perfil detectado pelo *primer* OPG-10.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 7300; 2, amostra do sorotipo 3 isolada de campo.

A amostra 6941 apresentou perfil de RAPD semelhante ao obtido com o sorotipo 7 com o *primer* OPG-10. Entretanto, foi detectada a presença dos genes que codificam para ApxIIA e ApxIIIA nesta amostra. Considerando que apenas ApxIIA é característica do sorotipo 7; não foi possível caracterizar esta amostra através de RAPD (Figura 20).

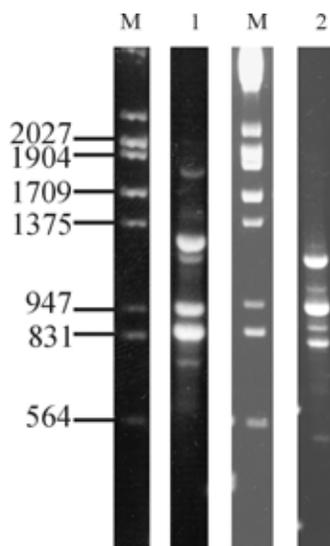


FIGURA 19- Genotipificação da amostra não sorotificável 6949 através do perfil detectado pelo *primer* OPG-10.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 6967 do sorotipo 3; 2, amostra 6949.

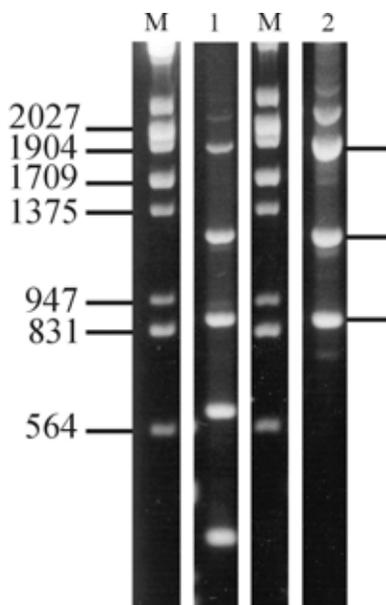


FIGURA 20- Perfil de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 na amostra não sorotificável 6941.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 6941; 2, amostra do sorotipo 7.

3.3.1.2 Resultados obtidos com o *primer* OPG-19 em amostras não sorotipificáveis isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia

A maioria dos produtos de amplificação detectados pelo OPG-19 foi comum a muitos sorotipos, portanto sua aplicação nas amostras não sorotipificáveis não foi determinante na caracterização destes isolados. Destas amostras, 12 apresentaram o mesmo perfil, o qual foi semelhante ao encontrado em amostras dos sorotipos 1, 3, 5 e 11.

Com este *primer*, as amostras 6949 e 7300 apresentaram polimorfismos de RAPD divergentes dos previamente detectados nas amostras sorotipificadas. Contudo, foi possível caracterizá-las através do perfil detectado pelo *primer* OPG-10 (Figura 21).

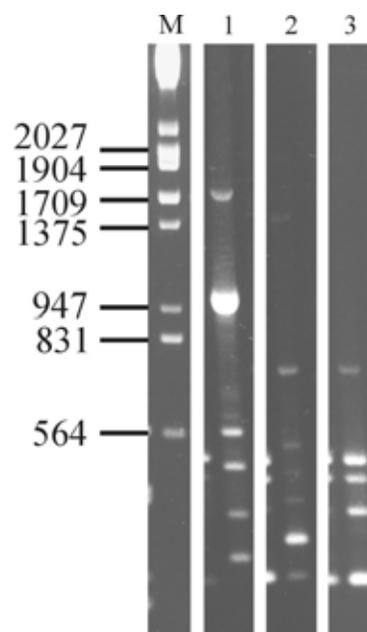


FIGURA 21- Perfis de RAPD divergentes, detectados pelo *primer* OPG-19 em amostras não sorotipificáveis.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 6949; 2, amostra 7300; 3, amostra não sorotipificável, demonstrando o perfil predominante detectado com o *primer* para amostras não sorotipificáveis.

3.3.2 Amostras isoladas de suínos sem sinais clínicos da enfermidade, procedentes de rebanhos

Entre as amostras não sorotificáveis de *A. pleuropneumoniae* obtidas de rebanhos sem sinais clínicos da enfermidade, somente a 7047 apresentou um perfil semelhante aos já obtidos com amostras sorotificáveis, com ambos os *primers*. O perfil dessa amostra, obtido com o *primer* OPG-10, associado à presença dos genes para ApxIIA e ApxIIIA, foi compatível com o obtido com o sorotipo 3 isolado de campo (Figura 22). Os resultados encontrados com ambos os *primers* para as demais amostras deste grupo foram distintos daqueles previamente detectados nas amostras sorotificadas ou amostras de referência, não sendo possível caracterizá-las (Figura 23).

Um resumo da caracterização por RAPD das amostras não sorotificadas isoladas de casos clínicos de pleuropneumonia e de animais de rebanhos sem sinais clínicos da enfermidade é apresentado na Tabela 7. A Tabela 8 apresenta os resultados da genotipificação de todas as amostras sorotificáveis e não sorotificáveis de *A. pleuropneumoniae* analisadas no presente trabalho. Os dados apresentados na Tabela 9 resumem as informações obtidas em estudos anteriores a este, sobre as amostras isoladas de suínos de rebanhos sem sinais clínicos de pleuropneumonia. São indicados os resultados de sorologia com ELISA-LPS polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7 de *A. pleuropneumoniae* (KICH, 1996), detecção dos genes *apxA* (COLLARES, 2000) e detecção dos genes *cpx* (KLEIN, 2000).

TABELA 7. Amostras não sorotificáveis de *A. pleuropneumoniae* caracterizadas através de RAPD.

CC, amostras isoladas de suínos com casos clínicos de pleuropneumonia

R, amostras isoladas de suínos de rebanhos sem sinais clínicos de pleuropneumonia

* Perfil de RAPD compatível com o sorotipo 3 ou 5.

	CC			R	
	Total	S3*	S5*	Total	S3*
amostras caracterizadas	13	12	1	1	1
amostras não caracterizadas	1	-	-	3	-

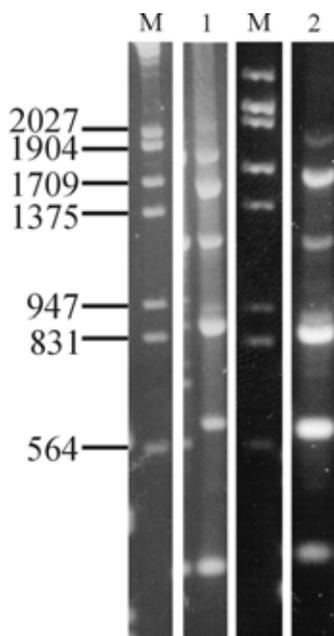


FIGURA 22- Caracterização da amostra não sorotipificável 7047 pelo *primer* OPG-10.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 7047; 2, amostra do sorotipo 3 isolada de campo.

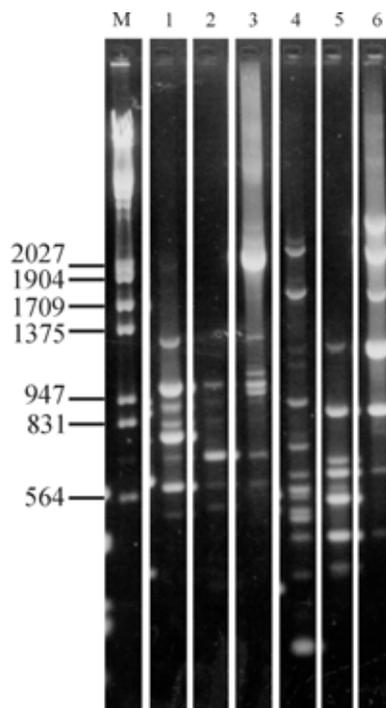


FIGURA 23- Amostras NAD-dependente não caracterizadas por RAPD, isoladas de suínos sem sinais clínicos.

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, amostra 6953, *primer* OPG-10; 2, amostra 6964, *primer* OPG-10; 3, amostra 6980, *primer* OPG-10; 4, amostra 6953, *primer* OPG-19; 5, amostra 6964, *primer* OPG-19; 6, amostra 6980, *primer* OPG-19

TABELA 8. Resultados da genotipificação por RAPD das amostras de *A. pleuropneumoniae*.

CC: amostras obtidas de suínos com casos clínicos de pleuropneumonia; R: amostras obtidas de suínos de rebanhos sem sinais clínicos de pleuropneumonia; NT: amostras não sorotipificáveis; NC: amostras não caracterizadas por RAPD; *sorotipo determinado pela técnica de imunodifusão em gel de agarose; **perfil compatível, determinado por RAPD.

Amostra	Origem	Genes <i>apx</i>			Genes <i>cpx</i>	*Sorotipo	**RAPD
		I	II	III			
6634	CC		•	•	•	3	3
6635	CC		•	•	•	3	3
6636	CC		•	•	•	3	3
6654	CC		•	•	•	3	3
6735	CC		•	•	•	NT	3
6740	CC	•	•		•	5b	5
6742	CC		•	•	•	3	3
6743	CC	•	•		•	5b	5
6744	CC	•	•		•	5b	5
6745	CC	•	•		•	5b	5
6746	CC	•	•		•	5b	5
6747	CC		•		•	7	7
6751	CC	•	•		•	5b	5
6752	CC		•		•	7	7
6754	CC	•	•		•	5b	5
6778	CC	•	•		•	5b	5
6789	CC	•	•		•	5b	5
6790	CC	•	•		•	5b	5
6791	CC		•	•	•	3	3
6792	CC	•	•		•	5b	5
6796	CC	•	•		•	5b	5
6800	CC	•	•		•	5b	5
6801	CC	•	•		•	5b	5
6802	CC	•	•		•	5b	5
6803	CC		•		•	7	7
6804	CC		•		•	7	7
6805	CC	•	•		•	5b	5
6806	CC	•	•		•	5b	5
6807	CC	•	•		•	5b	5
6813	CC	•	•		•	5b	5
6815	CC	•	•		•	5b	5
6816	CC		•		•	7	7
6822	CC	•	•		•	5b	5
6823	CC		•	•	•	3	3
6824	CC		•	•	•	3	3
6825	CC	•	•		•	11	11
6826	CC	•	•		•	5b	5
6827	CC	•	•		•	5	5

Amostra	Origem	Genes <i>apx</i>			Genes <i>cpx</i>	*Sorotipo	**RAPD
		I	II	III			
6829	CC	•	•		•	3	11
6830	CC		•	•	•	3	3
6832	CC	•	•		•	1	1
6834	CC	•	•		•	5b	5
6835	CC		•	•	•	3	3
6850	CC		•	•	•	3	3
6857	CC	•	•		•	5a	5
6876	R7		•		•	7	7
6936	CC		•	•	•	3	3
6941	CC		•	•	•	NT	NC
6942	CC		•	•	•	NT	3
6943	CC		•	•	•	NT	3
6945	CC		•	•	•	NT	3
6946	CC		•	•	•	NT	3
6947	CC		•	•	•	NT	3
6948	CC		•	•	•	NT	3
6949	CC		•	•	•	NT	3
6953	R20		•	•		NT	NC
6964	R7	•				NT	NC
6967	CC		•	•	•	3	3
6974	R7		•		•	7	7
6975	R7		•		•	7	7
6980	R7		•		•	NT	NC
7011	R4		•		•	12	12
7047	R11		•	•	•	NT	3
7058	CC	•	•		•	NT	5
7114	CC		•	•	•	3	3
7164	CC		•	•	•	3	3
7180	CC		•	•	•	3	3
7222	CC		•	•	•	NT	3
7258	CC	•	•		•	1	1
7276	CC		•	•	•	NT	3
7277	CC		•	•	•	NT	3
7300	CC		•	•	•	NT	3
7319	CC	•	•		•	4	NC
7328	CC		•		•	7	7
7329	CC		•		•	7	7
7350	CC	•	•		•	4	NC

3.4 Aplicação da técnica de RAPD em amostras de *A. minor* e *A. indolicus* isoladas de suínos sem sinais clínicos da enfermidade, procedentes de rebanhos

As amostras NAD-dependente 6983 e 7045, identificadas como *A. minor* e *A. indolicus*, respectivamente, foram submetidas a RAPD com os *primers* OPG-10 e OPG-19, os quais detectaram polimorfismos divergentes dos observados nas amostras sorotipificadas de referência ou isoladas de campo de *A. pleuropneumoniae*. Estes resultados são demonstrados na Figura 24.

Tabela 9. Amostras não sorotipificáveis isoladas de leitões de rebanhos sem sinais clínicos, analisadas através de RAPD

**status* do rebanho; ELISA, sorologia do rebanho através de ELISA-LPS; *cpx*, detecção por PCR dos genes *cpx*; *apxA*, detecção por PCR dos genes *apxA*; **sorotipo provável, de acordo com o perfil de *apxA*; RAPD, caracterização através de RAPD; S, sorotipo determinado por imunodifusão; SR, sem registro prévio de pleuropneumonia; NC, não caracterizada por RAPD.

amostra	rebanho	<i>status</i> *	ELISA	<i>cpx</i>	<i>apxA</i>	sorotipo provável**	RAPD
6964	7	surto S7	positivo	-	I	10	NC
6980	7	surto S7	positivo	+	II	7 ou 12	NC
7047	11	SR	negativo	+	II e III	2, 3, 4, 6 ou 8	S3
6953	20	SR	negativo	-	II e III	2, 3, 4, 6 ou 8	NC

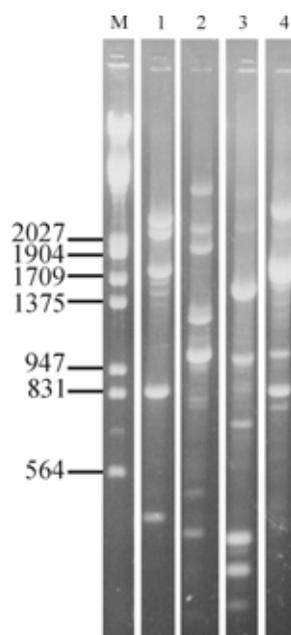


FIGURA 24- Perfil de RAPD detectado pelos *primers* OPG-10 e OPG-19 para *A. minor* e *A. indolicus*

M, marcador de tamanho molecular em pb (DNA de λ clivado com *Hind*III + *Eco*RI); 1, *A. minor*, *primer* OPG-10; 2, *A. indolicus*, *primer* OPG-10; 3, *A. minor*, *primer* OPG-19; 4, *A. indolicus*, *primer* OPG-19.

3.5 Avaliação dos resultados

O programa *RAPDistance* foi utilizado para estabelecer a relação filogenética a partir do polimorfismo de RAPD detectado pelos *primers* OPG-10 e OPG-19 entre as amostras ATCC e amostras de *A. pleuropneumoniae* isoladas de campo. O resultado é apresentado na forma de dendrograma (Figura 25). Foram demonstrados os diferentes perfis obtidos para o sorotipo 3 com as amostras 6742 e 6967, além do perfil predominante para o sorotipo.

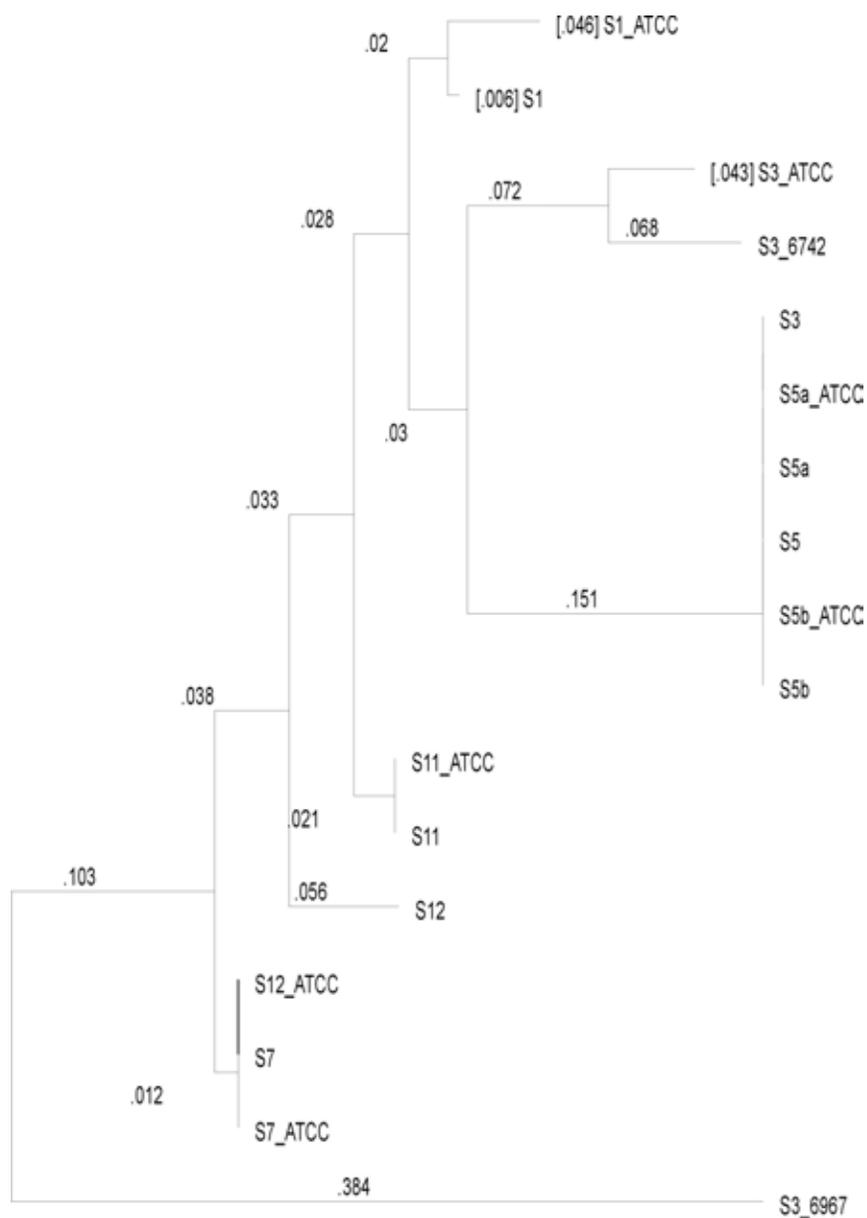


FIGURA 25- Relação filogenética estabelecida pelo programa *RAPDistance* para os perfis de RAPD detectados pelos primers OPG-10 e OPG-19 nas amostras de *A. pleuropneumoniae* analisadas.

S, sorotipo de *A. pleuropneumoniae*; ATCC (*American Type Collection*) amostra de referência do sorotipo.

4. DISCUSSÃO

Embora nem todos os métodos diagnósticos para pleuropneumonia suína determinem o sorotipo de *A. pleuropneumoniae* envolvido num surto da enfermidade, esta informação é imprescindível à implantação de estratégias para o controle da doença e para os estudos de epidemiologia do agente. O sucesso da adoção de um programa de profilaxia é condicionado em grande parte ao conhecimento dos sorotipos prevalentes na região, os quais determinam as linhagens a serem empregadas nas vacinas. Portanto, a caracterização do sorotipo deve ser rápida e precisa.

A sorotipificação é o método usualmente empregado com este objetivo, entretanto a ocorrência de similaridade estrutural de antígenos entre determinados sorotipos de *A. pleuropneumoniae* torna-a imprecisa em alguns casos, ocorrendo ainda linhagens que se apresentam não sorotipificáveis. Deste modo, a busca por métodos de caracterização molecular que permitam contornar as dificuldades geralmente presentes na tipificação realizada por métodos fenotípicos vem sendo investigada em diversos organismos.

Logo após o desenvolvimento da técnica de RAPD, sua capacidade em distinguir linhagens de um mesmo organismo começou a ser investigada em diferentes espécies bacterianas. Sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* puderam ser diferenciados através da técnica (PREUS *et alii*, 1993). De forma semelhante a *A. pleuropneumoniae*, a caracterização fenotípica desta espécie muitas vezes resulta em amostras não sorotipificáveis. Posteriormente, foram identificados 17 padrões de RAPD entre os 5 sorotipos e amostras não sorotipificáveis de *A. actinomycetemcomitans* (SAARELA *et alii*, 1995). Em *A. pleuropneumoniae*, a utilização da técnica para a genotipificação possibilitou a caracterização de amostras não sorotipificáveis e amostras que apresentaram reações cruzadas nas provas de sorotipificação (HENNESSY *et alii*, 1993).

Considerando a freqüente ocorrência de amostras cuja sorotipificação é imprecisa ou não é possível nesta espécie, os resultados de caracterização de microorganismos

através da técnica, disponibilizados por vários autores, permitiram dirigir a utilização de RAPD para a genotipificação de *A. pleuropneumoniae*. Uma vez que diferenças observadas nos perfis de RAPD obtidos entre linhagens distintas de um mesmo organismo podem claramente distinguir os isolados (CHARLTON *et alii*, 1999), procurou-se avaliar a capacidade do ensaio em genotipificar as amostras sorotipificáveis, objetivando correlacionar o polimorfismo de RAPD com o sorotipo. Com isso, foram fornecidos subsídios para a caracterização das amostras não sorotipificáveis.

Embora a aplicabilidade da técnica na diferenciação dos sorotipos de referência (HENNESSY *et alii*, 1993) e de isolados de campo dos sorotipos 1 e 5 de *A. pleuropneumoniae* já fosse comprovada (CHATELLIER *et alii*, 1999), essa informação não havia sido pesquisada em amostras isoladas de campo do Brasil. No presente trabalho, foi possível estabelecer o padrão de polimorfismo de DNA para as amostras sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* isoladas de campo no país, utilizando diferentes *primers* para RAPD. Um destes, o OPG-10, caracterizou a maioria dos diferentes sorotipos testados. Estes perfis foram comparados aos obtidos com as amostras não sorotipificáveis, esperando-se que estas apresentassem algum dos perfis previamente estabelecidos para as amostras sorotipificadas. De acordo com PAJU *et alii* (1998), a ocorrência de um mesmo perfil de RAPD entre estas amostras pode indicar uma origem comum.

Entre os *primers* testados para a genotipificação de *A. pleuropneumoniae*, foram selecionados o OPG-10 e o OPG-19, dos quais apenas o primeiro produziu polimorfismo de RAPD adequado para a caracterização dos sorotipos. A dificuldade na seleção de *primers* para RAPD, capazes de evidenciar diferenças no genoma que permitam diferenciar sorotipos de um mesmo agente infeccioso, é relatada por muitos autores. De modo semelhante, um conjunto de 20 *primers* foi testado para a genotipificação de *A. actinomycetemcomitans* por RAPD; dos quais somente 2 foram capazes de discriminar as amostras (SAARELA *et alii*, 1995). Do mesmo conjunto de *primers* que adotamos, 12 foram utilizados para a diferenciação por RAPD de *Pasteurella multocida* e *Pasteurella haemolytica*; sendo que 2 produziram polimorfismos de DNA capazes de diferenciá-las (CHASLUS-DANCLA *et alii*, 1996).

No presente estudo, assim como nos demais citados, a maioria dos *primers* foi inadequada para a diferenciação dos sorotipos devido à incapacidade em amplificar o DNA *template*, amplificação de um pequeno número de segmentos do DNA, ou amplificação de segmentos comuns aos diferentes sorotipos. De acordo com CHARLTON *et alii* (1999), há possibilidade de amplificar diferentes segmentos de DNA com cada *primer*; entretanto, muitos não diferenciam as linhagens. A identificação de apenas dois *primers* adequados para o objetivo do presente trabalho não foi surpreendente, considerando a base teórica da técnica de RAPD; na qual a amplificação do DNA ocorre de forma aleatória. A utilização de um maior número de *primers* pode aprimorar o poder de discriminação da técnica. Para tanto, devem ser adotados numa mesma reação, de modo a não torná-la laboriosa (SAARELA *et alii*, 1995). Contudo, não é possível assegurar o incremento do número de produtos de RAPD amplificados.

A utilização do *primer* OPG-10 caracterizou os sorotipos 1, 7, 11 e 12, detectando polimorfismos semelhantes entre os sorotipos 3, 4 e 5. Os sorotipos 3 e 5 foram diferenciados pelo perfil de exotoxinas Apx, característico a cada um, previamente determinado através de PCR por COLLARES (2000). Realizando a tipificação por RAPD de amostras dos sorotipos 1 e 5 de *A. pleuropneumoniae*, CHATELLIER *et alii* (1999) concluíram que a técnica foi adequada para tipificar amostras do sorotipo 1. Para a caracterização do sorotipo 5, foram necessárias técnicas moleculares complementares, entre as quais, a detecção dos genes *apx* através de PCR.

Utilizando o *primer* OPG-10, as amostras do sorotipo 4 isoladas de campo apresentaram polimorfismo de RAPD distinto do identificado na amostra de referência. Utilizando a técnica de PCR padronizada por COLLARES (2000), estes isolados apresentaram a amplificação dos genes para as toxinas ApxIA e ApxIIA, diferentemente do esperado para o sorotipo; produtor de ApxIIA e ApxIII. Divergências no perfil de toxinas característico para sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, detectado através de PCR, já foram relatadas na espécie por CHATELLIER *et alii* (1999). As amostras deste sorotipo foram também positivas para a presença dos genes *cpx*, envolvidos no transporte de cápsula; detectados pela reação de PCR padronizada por KLEIN (2000).

O perfil de RAPD detectado com ambos os *primers* para as duas amostras do sorotipo 4 obtidas de campo foi semelhante ao identificado nas amostras dos sorotipos 3 e 5. Estas amostras do sorotipo 4 foram isoladas entre os anos de 2000 e 2001, num intervalo de seis meses, e eram procedentes do mesmo município do estado de Santa Catarina; tratando-se do primeiro registro deste sorotipo pela Embrapa Suínos e Aves (PIFFER³, 2001- Informe verbal). Todas as amostras dos sorotipos 3 e 5 analisadas no presente estudo foram isoladas em anos anteriores; indicando a impossibilidade do perfil de RAPD obtido com estes sorotipos tratarem-se do sorotipo 4.

Embora as reações nas quais o *primer* OPG-19 foi utilizado para a diferenciação dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* tenham resultado em muitos produtos de amplificação comuns entre os sorotipos, este foi selecionado para o trabalho devido à necessidade em dispor de, pelo menos, dois diferentes oligonucleotídeos para a genotipificação. Deste modo, é possível que um *primer* diferencie sorotipos que não tenham sido caracterizados pelo outro. A utilização de dois diferentes *primers* isoladamente em cada reação aumenta a capacidade de discriminação entre linhagens que produzem padrões similares de RAPD, conquanto somente um *primer* é utilizado (CHARLTON *et alii*; 1999). Essa situação foi evidenciada com as amostras não sorotipificáveis 6949 e 7300, cujo perfil com o OPG-19 foi distinto dos obtidos com amostras sorotipificáveis, sendo caracterizadas pelo OPG-10. Situação semelhante é descrita por GEARY *et alii* (1994), os quais utilizaram 2 diferentes *primers* individualmente para a diferenciação de linhagens de *M. gallisepticum* através de RAPD. Algumas vezes, as amostras não foram distintas por um *primer*, sendo então diferenciadas pelo outro.

Acredita-se que os perfis de RAPD obtidos para as amostras sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* possam ser observados em demais amostras desta espécie isoladas no Brasil, que venham a ser analisadas sob as mesmas condições. No estudo de SAARELA *et alii* (1995), os isolados de *A. actinomycetemcomitans* de mesmo sorotipo, obtidos de indivíduos não relacionados, muitas vezes apresentaram o mesmo polimorfismo de RAPD. Para tanto, salienta-se que as condições da reação devem ser

³ Dr. Itamar Piffer. Embrapa Suínos e Aves. Br. 153, Km 110, Concórdia, SC.

semelhantes às utilizadas em nosso estudo. Padrões idênticos de RAPD podem ser obtidos de diferentes extrações de DNA da mesma cepa, conforme relatado por CHARLTON *et alii* (1999) e confirmado por nosso trabalho.

Além de *A. pleuropneumoniae*, a técnica de RAPD não foi aplicada a outras espécies NAD-dependente isoladas do trato respiratório superior de suínos. Deve ser considerado que foram utilizadas amostras puras do agente, assegurando que os polimorfismos de RAPD obtidos são característicos da espécie. Os polimorfismos de RAPD detectados pelos *primers* OPG-10 e OPG-19 nas amostras de *A. minor* e *A. indolicus* foram distintos dos obtidos para os isolados de *A. pleuropneumoniae*, reforçando a afirmação. Utilizando a mesma técnica, porém com *primers* e condições diferentes, perfis distintos de RAPD foram detectados em amostras de *A. pleuropneumoniae*, *A. suis*, *E. coli*, *H. parasuis* e *P. multocida* (HENNESSY *et alii*, 1993). Com a ressalva de tratar-se de um organismo de outra espécie, *M. gallisepticum*, os polimorfismos de RAPD detectados neste agente foram distintos de espécies relacionadas de *Mycoplasma*, para as quais foram utilizados os mesmos *primers* e idênticas condições da técnica (GEARY *et alii*, 1994).

Alguns isolados de *M. gallisepticum* apresentaram perfis de RAPD semelhantes com um mesmo *primer*, sugerindo que pertençam à mesma linhagem (GEARY *et alii*, 1994). Isto em parte é confirmado por nossos resultados, nos quais as amostras sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae* apresentaram perfis característicos com o *primer* OPG-10, de acordo com o sorotipo; à exceção dos sorotipos 3, 4 e 5, os quais não foram diferenciados com este *primer*. Este tipo de informação reforça a utilidade da técnica de RAPD em estudos de epidemiologia do agente infeccioso. Linhagens que demonstram o mesmo padrão de amplificação podem ser originadas da mesma propriedade, indicando origem comum (GEARY *et alii*, 1994).

Diferentes linhagens de *M. gallisepticum* apresentaram perfis similares (CHARLTON *et alii*, 1999), sugerindo-nos que precauções devem ser consideradas ao assumir que dois isolados com o mesmo padrão de RAPD tratam-se da mesma cepa. Deve-se considerar que *A. pleuropneumoniae* é um organismo de genoma mais complexo, portanto esta possibilidade parece mais remota. Essa situação é reportada aos

resultados obtidos com as amostras isoladas de campo dos sorotipos 3, 4 e 5, os quais apresentaram perfis de RAPD semelhantes com o *primer* OPG-10. Neste sentido, a similaridade dos polimorfismos de RAPD da amostra não sorotipificável 6949 e da amostra sorotipificada 6967 é reforçada através do idêntico perfil de genes para as exotoxinas detectadas em ambas as amostras.

Os sorotipos 1, 7, 11 e 12 de *A. pleuropneumoniae* demonstraram entre si diferentes perfis de RAPD com o OPG-10. Os polimorfismos obtidos não apresentaram variações nas diferentes amostras de um mesmo sorotipo. Embora os perfis identificados nos sorotipos 4 e 5 tenham sido semelhantes, estes também não apresentaram variações no perfil em diferentes amostras analisadas destes sorotipos. Entretanto, com esse mesmo *primer*, diferentes isolados do sorotipo 3 demonstraram quatro diferentes perfis de RAPD, todos distintos do obtido com a amostra de referência do sorotipo. O perfil predominante, observado em 14 das 17 amostras analisadas deste sorotipo, foi semelhante ao identificado com este mesmo *primer* nas amostras dos sorotipos 4 e 5. Essa observação parece indicar que o *primer* OPG-10 foi mais adequado para indicar a heterogeneidade nesta cepa. Essa conclusão é reforçada pelos dados obtidos por SAARELA *et alii* (1995), os quais encontraram diferentes perfis de RAPD para um mesmo sorotipo de *A. actinomycetemcomitans*. O polimorfismo de DNA identificado através do *primer* OPG-10 na amostra 6829, caracterizada como sendo do sorotipo 3, foi divergente do esperado para o sorotipo. Este perfil de RAPD foi compatível com o obtido com o mesmo *primer* para o sorotipo 11, o que foi reforçado pela presença dos genes para ApxIA e ApxIIA na amostra, característicos deste sorotipo. Esta amostra foi novamente submetida a sorotipificação, não sendo, contudo, possível sua caracterização de maneira conclusiva.

Os polimorfismos distintos de RAPD, detectados pelo *primer* OPG-10 na amostra de referência e nos isolados de campo do sorotipo 3, ressaltam as diferenças no genoma de amostras deste sorotipo isoladas em diferentes países, as quais têm sido relatadas como apresentando variações quanto à virulência. Embora considerado menos patogênico, se comparado aos demais sorotipos envolvidos em pleuropneumonia aguda, no Brasil, o sorotipo 3 vem sendo isolado de lesões características da enfermidade

(PIFFER *et alii*, 1987). Esta observação sugere que a técnica de RAPD pode ser utilizada para evidenciar possíveis diferenças no genoma de isolados de um mesmo sorotipo de *A. pleuropneumoniae* com diferentes graus de patogenicidade.

A heterogeneidade encontrada nas amostras do sorotipo 3, pode ser justificada pela capacidade da técnica em detectar mutações pontuais, deleções ou inserções no DNA alvo, o que pode alterar o perfil de RAPD esperado (WILLIAMS *et alii*, 1993). Deve-se considerar que este foi um dos primeiros sorotipos a ser isolado no Brasil, ocorrendo a partir do ano de 1986 (PIFFER *et alii*, 1997). Portanto, perfis alternativos de RAPD poderiam ser esperados para o sorotipo 3, devido a uma possível maior variabilidade. Além do resultado obtido com o OPG-10, a amostra 6967 do sorotipo 3 também apresentou polimorfismo de RAPD distinto do perfil predominante detectado pelo *primer* OPG-19, o que reforça a variabilidade desta amostra.

A detecção de alterações no DNA através da técnica parece justificar a ocorrência de diferenças no polimorfismo de RAPD detectado pelo *primer* OPG-10 nas amostras isoladas de campo dos sorotipos 1, 3, 4 e 12 e as respectivas amostras de referência. Perfis de RAPD divergentes entre isolados de campo e amostras de referência são esperados, visto que se tratam de amostras obtidas em diferentes países.

HENNESY *et alii* (1993) sugerem que amostras de *A. pleuropneumoniae* cujos polimorfismos de RAPD não sejam compatíveis com os determinados para amostras sorotipificáveis devem ser investigadas para a presença de plasmídeos. Entretanto, polimorfismos distintos não devem ser atribuídos unicamente à presença de plasmídeos, cuja influência no perfil de RAPD é o acréscimo de produtos de amplificação de DNA ao polimorfismo já determinado. WARDS *et alii* (1998) concluíram ser possível que a presença de plasmídeos altere o genótipo detectado pela clivagem por endonucleases de restrição em sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, aos quais foram atribuídas diferenças menores entre os padrões de clivagem obtidos. Tendo em vista que estes autores não detectaram a presença de plasmídeos em todas as amostras de *A. pleuropneumoniae* analisadas, outras causas precisam ser consideradas para a ocorrência de perfis alternativos de RAPD.

Diversas características estruturais de *A. pleuropneumoniae* determinam diferenças fenotípicas e diversidade antigênica. Porém, é importante salientar que, embora seja possível correlacionar a genotipificação obtida por RAPD com o sorotipo de *A. pleuropneumoniae*, a técnica não permite estabelecer a relação entre qualquer segmento de DNA amplificado e características fenotípicas.

SAARELA *et alii* (1995) sugerem a baixa capacidade de tipificação de *A. actinomycetemcomitans* com a técnica de RAPD, a qual não diferenciou os isolados que apresentaram diferentes perfis por ribotipificação. A impossibilidade de diferenciar os sorotipos 3, 4 e 5 de *A. pleuropneumoniae* através do *primer* OPG-10, o qual foi mais adequado para caracterizar os sorotipos analisados, não leva à concordância com estes autores. Deve-se considerar que a pesquisa de outros *primers* para RAPD, com o objetivo de caracterização dos sorotipos não diferenciados, pode identificar um oligonucleotídeo adequado para este propósito.

A análise dos polimorfismos de RAPD permite tecer hipóteses sobre a relação dos isolados analisados. Linhagens de *M. gallisepticum* que demonstraram padrões de RAPD muito parecidos ou que não foram diferenciadas pelo mesmo *primer* podem ser relacionadas geneticamente (GEARY *et alii*, 1994). Os polimorfismos detectados nas amostras de *A. pleuropneumoniae* foram analisados através do programa RAPDistance (ARMSTRONG *et alii*, 1996), o qual estabeleceu a relação filogenética entre os diferentes perfis de RAPD obtidos com os *primers* OPG-10 e OPG-19. A análise é demonstrada na forma de dendrograma, o qual permite visualizar a similaridade entre as amostras analisadas e a distância entre si, determinadas pelo coeficiente de DICE (1945).

A aplicação de RAPD nas amostras previamente sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae* determinou os possíveis polimorfismos de RAPD a serem identificados nas amostras não sorotipificáveis. Entre as 18 amostras não sorotipificáveis analisadas pela técnica, 14 puderam ser caracterizadas, das quais 13 foram isoladas de suínos com sinais clínicos da enfermidade e uma foi isolada de leitão procedente de rebanho, sem sinais clínicos de pleuropneumonia. Das amostras de casos clínicos, 12 apresentaram genotipificação compatível com o sorotipo 3, o que foi reforçado pela

presença dos genes que codificam para ApxIIA e ApxIIIA, característicos deste sorotipo. A amostra restante teve a genotipificação compatível com o sorotipo 5. A única amostra não sorotipificável obtida de rebanho, caracterizada pela técnica, apresentou perfil de RAPD compatível com o sorotipo 3.

O grande número de amostras não sorotipificáveis cuja genotipificação foi compatível com o sorotipo 3 parece sugerir que estes isolados sejam provenientes de surtos relacionados de pleuropneumonia. No entanto, as informações disponibilizadas sobre a origem das amostras não foram suficientes para comprovar esta possibilidade.

Nossos dados indicam que os perfis de RAPD identificados nos sorotipos 3, 4 e 5 são bastante semelhantes. Em princípio, amostras não sorotipificáveis apresentando este perfil não poderiam ser diferenciadas quanto ao sorotipo correto. Contudo, as amostras analisadas que apresentaram este perfil devem ser, provavelmente, pertencentes aos sorotipos 3 ou 5, uma vez que foram isoladas em anos anteriores ao surgimento do sorotipo 4 no Brasil. No entanto, essa observação reforça a necessidade de identificar um *primer* para RAPD que possa diferenciar estes sorotipos, de modo que a técnica possa ter validade na caracterização de amostras isoladas a partir de então, devido a possível distribuição do sorotipo 4 a outras regiões do país.

Entre as 4 amostras não sorotipificáveis cuja caracterização não foi possível através de RAPD, 3 foram obtidas de leitões de rebanhos, sem sinais clínicos; e uma foi isolada de animal com sinais clínicos da enfermidade. Esta amostra, a 6941, apresentou perfil de RAPD compatível com o sorotipo 7, através do *primer* OPG-10. No entanto, a presença dos genes que codificam para ApxIIA e ApxIIIA indica a possibilidade de ser algum dos sorotipos 2, 3, 4, 6, ou 8. Destes, a Embrapa Suínos e Aves relata o isolamento no Brasil apenas dos sorotipos 3 e 4. Portanto, é possível que a amostra seja uma variante destes sorotipos, especialmente do sorotipo 3; o qual encontra-se no ambiente há mais tempo, possivelmente refletindo no perfil alternativo de RAPD identificado. Novamente, ressalta-se que o sorotipo 3 foi a linhagem que apresentou maior variabilidade nos polimorfismos de RAPD obtidos com o *primer* OPG-10.

As três amostras de rebanhos não caracterizadas por RAPD apresentaram polimorfismos bastante distintos, os quais não foram encontrados nas amostras

sorotipificadas de *A. pleuropneumoniae* e em amostras de referência dos diferentes sorotipos. Na amostra 6964 havia sido detectada a presença do gene para ApxIA (COLLARES, 2000), tornando-a compatível com o sorotipo 10, cuja detecção dessa única toxina é característica. No entanto, essa informação não pode ser confirmada por RAPD, visto que diferenças entre os polimorfismos da amostra ATCC e o respectivo isolado de campo podem ocorrer, da mesma forma como registrado com as amostras dos sorotipos 1, 3, 4 e 12. Essa amostra foi isolada de um rebanho positivo para o teste de ELISA-LPS polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7 de *A. pleuropneumoniae* (KICH, 1996) e acometido por um surto da enfermidade, causado pelo sorotipo 7 (Tabela 9). Segundo KLEIN (2000), esta amostra foi negativa para a detecção por PCR dos genes *cpx*, envolvidos no transporte de cápsula; o qual é considerado uma prova espécie-específica para *A. pleuropneumoniae*. Embora este ensaio não detecte a presença destes genes na amostra de referência do sorotipo 4; sua aplicação nas amostras isoladas de campo deste sorotipo, realizada no presente estudo, foi positiva. Portanto, o resultado negativo para a presença dos genes *cpx* nesta amostra sugere a possibilidade de ser outro organismo NAD-dependente, que não *A. pleuropneumoniae*.

Por sua vez, a amostra 6980 possui o gene que codifica para ApxIIA (COLLARES, 2000), sugerindo ser do sorotipo 7 ou 12, únicos produtores desta toxina isoladamente. Esta amostra foi também positiva para a presença dos genes *cpx* (KLEIN, 2000). Amostras dos sorotipos 7 e 12 foram analisadas por RAPD e os perfis detectados foram distintos do obtido com esta amostra, a qual não pode ser caracterizada pela técnica. É importante ressaltar que esta amostra foi isolada de um rebanho com registro prévio de *A. pleuropneumoniae*, detectado por ELISA (KICH, 1996), e no qual foi registrado um surto causado pelo sorotipo 7 (Tabela 9). A amostra 6953 apresentou os genes para ApxIIA e ApxIIIa (COLLARES, 2000), tornando-a compatível com os sorotipos 2, 3, 4, 6 e 8. Contudo, não foi identificada a presença dos genes *cpx* (KLEIN, 2000), o que possivelmente indica não se tratar de *A. pleuropneumoniae*, e sim de outro organismo NAD-dependente. Essa amostra foi isolada de um rebanho sem registro da enfermidade e negativo através de ELISA (KICH, 1996), conforme indicado na Tabela 9.

Uma questão a ser considerada sobre as amostras negativas para a presença de *cpx* e não caracterizadas através de RAPD é a ausência de informações quanto à presença de genes para *ApxIV* e seqüenciamento de rDNA 16S, não realizados até o presente momento. Uma vez que muitos isolados do grupo do qual originaram-se foram inicialmente identificados por métodos fenotípicos como *A. pleuropneumoniae* e posteriormente reclassificados por ambas as técnicas moleculares como outros organismos (COSTA *et alii*, 2001- Informe verbal); a possibilidade de que estas amostras não sejam *A. pleuropneumoniae* não pode ser desconsiderada. Diferentemente do que foi sugerido para *A. actinomycetemcomitans* por PAJU *et alii* (1998) em situação semelhante, a ocorrência destas amostras não sorotipificáveis, cujo polimorfismo de RAPD não foi possível correlacionar com o genótipo de amostras sorotipificadas, não parece corresponder a novos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, além dos já descritos.

É provável que amostras não sorotipificáveis sejam originadas de amostras sorotipificáveis (PAJU *et alii*, 1998). As amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae* caracterizadas no presente trabalho apresentaram perfis de RAPD semelhantes aos identificados nas amostras sorotipificáveis, o que parece confirmar a afirmação destes autores. A ocorrência de amostras não sorotipificáveis sugere ainda a possibilidade de obter perfis de RAPD diferentes dos determinados para amostras sorotipificadas. Para SAARELA *et alii* (1995), isolados não sorotipificáveis de *A. actinomycetemcomitans* não produziram padrões únicos de RAPD, o que pode sugerir que estes isolados são originados de amostras tipificáveis que perderam a capacidade de reagir com o anti-soro específico. Contudo, essa hipótese não pode ser confirmada pela técnica de RAPD.

A capacidade de fornecer informações sobre o perfil genético na ausência de qualquer conhecimento da seqüência alvo de DNA torna a técnica de RAPD promissora para a tipificação de organismos. No entanto, o ensaio recebe diversas críticas quanto à reprodutibilidade dos resultados. Para TYLER *et alii* (1997), qualquer ensaio molecular utilizado na tipificação de microorganismos deve enquadrar-se nos critérios de possibilidade de tipificação e reprodução dos resultados, capacidade de discriminação e facilidade de realização e interpretação dos resultados, além de baixo custo de execução.

Segundo FARBER (1996), a reprodução dos resultados obtidos com a técnica está diretamente relacionada a sua padronização. Nossos resultados com as amostras de *A. pleuropneumoniae* comprovam que a repetição da técnica em diferentes isolados de mesmo sorotipo resultou no padrão esperado de RAPD, o que foi considerado reprodutibilidade do ensaio.

Embora o DNA genômico utilizado nas reações de RAPD não tenha sido quantificado, foi observada a reprodução do padrão de amplificação do DNA em repetidos ensaios, utilizando diferentes extrações de DNA da mesma amostra. Amostras cujo perfil de RAPD foi divergente dos demais obtidos foram novamente submetidas ao ensaio e reproduziram idêntico polimorfismo. GEARY *et alii* (1994) asseguraram a reprodução de seus resultados com a repetição da técnica em diferentes datas, utilizando diferentes culturas de cada cepa, extração de DNA e análise dos produtos de amplificação obtidos.

A ocorrência de variações no aparecimento de fragmentos amplificados de modo menos intenso pode ocorrer, conforme registrado em nosso trabalho e por outros autores que utilizaram a técnica (CHATELLIER *et alii*, 1999). Neste caso, para a análise dos polimorfismos de RAPD obtidos, são desconsiderados estes produtos de baixa intensidade de amplificação. Repetições da técnica durante a fase de padronização possibilitam identificar os segmentos que são seguidamente amplificados, os quais foram considerados para a caracterização do sorotipo.

Diferentes técnicas moleculares já foram propostas para a caracterização de *A. pleuropneumoniae*, porém os sorotipos costumam ser determinados por grupos; o que as tornam de pouca contribuição. A técnica de RAPD padronizada para a genotipificação de *A. pleuropneumoniae* foi adequada para a diferenciação dos sorotipos 1, 7, 11 e 12. A ocorrência de perfis de RAPD comuns aos sorotipos 3, 5, 5a e 5b não permitiu caracterizá-los unicamente pela técnica; todavia, foi possível com a utilização de PCR para a detecção dos genes que codificam para as exotoxinas de *A. pleuropneumoniae*. Isso não reduz a aplicabilidade do ensaio, mas o torna laborioso e oneroso se for aplicado com o único objetivo de caracterização. O sorotipo 4, pelo polimorfismo de RAPD semelhante aos sorotipos 3 e 5 e pelo perfil divergente de exotoxinas, não pode

ser caracterizado pelos *primers* selecionados. Essas observações não inviabilizam os resultados obtidos, uma vez que o sorotipo 4 somente foi isolado recentemente no país, porém ressalta a necessidade de identificação de *primers* adequados para a caracterização destes sorotipos a partir de então.

O ensaio de RAPD desenvolvido no presente trabalho complementa a caracterização das amostras de *A. pleuropneumoniae* obtida pelas técnicas de PCR para identificação dos genes *apxA* e *cpx*, desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa. Ambas identificam o agente, sem no entanto caracterizar o sorotipo. Isto indica a possibilidade de realizar o isolamento inicial em meio de cultivo seletivo, pesquisando a presença de *A. pleuropneumoniae* entre os isolados NAD-dependente através destes ensaios de PCR. As amostras identificadas como positivas poderiam ser submetidas a RAPD, de modo a caracterizar o sorotipo.

Considerando a capacidade de tipificação por RAPD das amostras de *A. pleuropneumoniae*, o trabalho indica como perspectivas uma nova pesquisa de *primers*, capazes de diferenciar os sorotipos 3, 4 e 5. Para isso, o conjunto de oligonucleotídeos, cujos *primers* foram testados individualmente no presente trabalho, pode ser investigado quanto ao uso em pares, numa mesma reação, procurando identificar outros perfis de RAPD, além dos já obtidos.

Com estas alterações, pode-se considerar a aplicação da técnica de RAPD como um método alternativo para a caracterização de amostras cuja sorotipificação é imprecisa ou não é possível realizar; ou ainda na caracterização de amostras não sorotipificáveis de *A. pleuropneumoniae*. Para qualquer aplicação, a utilização de isolados puros é essencial. Neste contexto, conclui-se que o ensaio foi adequado, sugerindo que possa vir a auxiliar nesse procedimento após a pesquisa de um *primer* adequado para a diferenciação dos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS- Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **A suinocultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.abipecs.com.br>>. Acesso em: 07 dez. 2001.

ANTUNES, R. De arroba a arroba. **Suinocultura Industrial**, n.154, p.42-43, 2001.

ARMSTRONG, J.; GIBBS, A.; PEAKALL, R.; WELLER, G. **The RAPDistance package**. Disponível em: <<http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapid.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2001.

BIBERSTEIN, E.L.; GUNNARSSON, A.; HURVELL, B. Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.1, p.7-11, 1977.

BECK, M.; van den BOSCH, J.F.; JONGENELEN, I.M.C.A.; LOEFFEN, P.L.W.; NIELSEN, R.; NICOLET, J.; FREY, J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.11, p.2749-2754, 1994.

BLACKALL, P.J. & PAHOFF, J.L. Characterisation of porcine haemophili isolated from Australian pigs between 1988 and 1992. **Australian Veterinary Journal**, v.72, n.1, p.18-21, 1995.

BLACKALL, P.J.; BOWLES, R.; PAHOFF, J.L.; SMITH, B.N. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in 1993 to 1996. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.1, 1999.

BLANCHARD, P.C.; WALKER, R.L.; GARDNER, I. Pleuropneumonia in swine associated with a urease-negative variant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.279-282, 1993.

BOHRER, P.B. Perspectivas da suinocultura no Centro-Oeste brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6., 1993, Goiânia. **RESUMOS**. Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1993. p.29-32.

BRANDRETH, S.R.; SMITH, I.M. Lack of pathogenicity of haemophili of the “*minor group*” taxon for the gnotobiotic piglet. **Research in Veterinary Science**, v.40, p.273-275, 1986.

BRANDRETH, S.R.; SMITH, I.M. Comparative virulence of some english strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 3 in the pig. **Research in Veterinary Science**, v.42, p.187-193, 1987.

CANEVER, M.D.; SANTOS FILHO, J.I.dos. Mudança tecnológica da suinocultura brasileira entre 1985-1995/96. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **RESUMOS**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p.525-526.

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, A.W. **Essentials of veterinary microbiology**. 5 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. Cap. 20: *Actinobacillus*: p.180-183.

CHARLTON, B.R.; BICKFORD, A.A.; WALKER, R.L.; YAMAMOTO, R. Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.2, p.158-161, 1999.

CHASLUS-DANCLA, E.; LESAGE-DESCAUSES, M.C.; LEROY-SÉTRIN, S.; MARTEL, J.L.; COUDERT, P.; LAFONT, J.P. Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella* from animals. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.91-102, 1996.

CHATELLIER, S.; HAREL, J.; DUGOURD, D.; CHEVALLIER, B.; KOBISCH, M.; GOTTSCHALK. Genomic relatedness among *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains of serotype 1 and 5 isolated from healthy and diseased pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.63, p.170-176, 1999.

CHIERS, K.; van OVERBEKE, I.; de LAENDER, P.; R. DUCATELLE; CAREL, S.; HAESEBROUCK, F. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. **The Veterinary Quarterly**, v.20, n.2, p.65-69, 1998.

CHIERS, K.; HAESEBROUCK, F.; van OVERBEKE, I.; CHARLIER, G.; DUCATELLE, R. Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. **Veterinary Microbiology**, v.68, p.301-306, 1999.

CHIERS, K.; HAESEBROUCK, F.; MATEUSEN, B.; van OVERBEKE, I.; DUCATELLE, R. Pathogenicity of *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus indolicus* and *Actinobacillus porcicus* strains for gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.48, p.127-131, 2001.

COLLARES, R.M. Análise molecular dos genes para as toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em isolados de campo. Porto Alegre, 2000. **Dissertação de**

Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

COSTA, A.T.R.; REIS, R.; REIS, F.T.; FIGUEIREDO, J.B. Sorotipificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados de lesões pulmonares de suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **RESUMOS**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p.178-180.

CRUIJSEN, T.; van LEENGOED, L.A.M.G.; HAM-HOFFIES, M.; VERHEIJDEN, J.H.M. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. **Infection and Immunity**, v.63, n.6, p.2341-2343, 1995.

CRUZ, W.T.; NEDIALKOV, Y.A.; THACKER, B.J.; MULKS, M.H. Molecular characterization of a common 48-Kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.64, n.1, p.83-90, 1996.

DESROSIERS, R. Control of bacterial respiratory diseases. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. **PROCEEDINGS**. Birmingham: International Pig Veterinary Society, 1998, p.5-9.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, n.3, p.297-302, 1945.

DIDIER, P.J.; PERINO, L.; URBANCE, J. Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*: microbiologic and pathologic findings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.716-719, 1984.

DOM, P.; HAESEBROUCK, F. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.39, p.303-306, 1992.

DOM, P.; HAESEBROUCK, F.; de BAETSELIER, P. Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.7, p.1113-1118, 1992.

DOM, P.; HAESEBROUCK, F.; KAMP, E.M.; SMITS, M.A. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains: production of RTX toxins and interactions with porcine phagocytes. **Veterinary Microbiology**, v.39, p.205-218, 1994.

DUFF, J.P.; SCOTT, W.A.; WILKES, M.K.; HUNT, B. Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. **Veterinary Record**, v. 139, p. 561-563, 1996.

EVOLUÇÃO DA SUINOCULTURA. **A evolução da suinocultura**. Disponível em: <<http://www.suino.com>>. Acesso em: 07 dez. 2001.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**. v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.

FAO- Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 26 mai. 2001.

FEDORKA-CRAY, P.J.; STINE, D.L.; GREENWALD, J.M.; GRAY, J.T.; HUETHER, M.J.; ANDERSON, G.A. The importance of secreted factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin preparation: a comparison. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.85-100, 1993.

FENWICK, B.W.; OSBURN, B.I.; OLANDER, H.J. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1433-1441, 1986.

FENWICK, B.; HENRY, S. Porcine pleuropneumonia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, n.9, p.1334-1340, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa, 1998. Análise genética com marcadores RAPD: p.142-143.

FODOR, L.; VARGA, J.; MOLNÁR, É.; HAJTÓS, I. Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. **Veterinary Microbiology**, v.20, p.173-180, 1989.

FONSECA, A.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; MARQUES, E.K. Diagnóstico molecular de patógenos respiratórios suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **RESUMOS**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p.155-156.

FREY, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends in Microbiology**, v.3, n.7, 257-261, 1995a.

FREY, J.; BECK, M.; van den BOSCH, J.F.; SEGERS, R.P.A.M.; NICOLET, J. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Molecular and Cellular Probes**, v.9, p.277-282, 1995b.

FUSSING, V. Genomic relationships of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 strains evaluated by ribotyping, sequence analysis of ribosomal intergenic regions, and pulsed-field gel electrophoresis. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.211-215, 1998a.

FUSSING, V.; BARFOD, K.; NIELSEN, R.; MOLLER, K.; NIELSEN, J.P.; WEGENER, H.C.; BISGAARD, M. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v.62, p.145-162, 1998b.

GAGNÉ, A.; LACOUTURE, S.; BROES, A.; D'ALLAIRE, S.; GOTTSCHALK, M. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 from tonsils. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.251-254, 1998.

GEARY, S.J.; FORSYTH, M.H.; SAOUD, S.A.; WANG, G.; BERG, D.E.; BERG, C.M. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. **Molecular and Cellular Probes**, v.8, p.311-316, 1994.

GERALD, G.F.; KLASHINSKY, S.; ANDERSON, C.; POTTER, A.A.; WILLSON, P.J. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **Infection and Immunity**, v.60, n.8, p.3253-3261, 1992.

GILBRIDE, K.A.; ROSENDAL, S. Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, p.445-450, 1983.

GOMES, M.F.M. Análise prospectiva do complexo agroindustrial de suínos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6., 1993, Goiânia. **RESUMOS**. Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1993. p.3-10.

GRAM, T.; JACOBSEN, M.J.; AHRENS, P.; NIELSEN, J.P. Diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tonsils by culture and polymerase chain reaction. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14., 1996, Bologna. **PROCEEDINGS**. Bologna: International Pig Veterinary Society, 1996, p.186.

GRAM, T.; AHRENS, P.; ANDREASEN, M.; NIELSEN, J.P. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes- evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.43-57, 2000.

GUNNARSSON, A.; BIBERSTEIN, E.L.; HURVELL, B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus paraahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.8, 1977.

GUNNARSSON, A. Evaluation of different antigens in the complement-fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*parahaemolyticus*) infections in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, n.11, p.1564-1567, 1979.

GUTIERREZ, C.B.; TASCÓN, R.I.; BARBOSA, J.I.R.; GONZALES, O.R.; VAZQUEZ, J.A.; FERRI, E.F.R. Characterization of V factor-dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases**, v.16, n.2, p.123-130, 1993.

HAESEBROUCK, F.; van de KERKHOF, A.; DOM, P.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R. Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.52, p.277-284, 1996.

HAESEBROUCK, F.; CHIERS, K.; van OVERBEKE, I.; DUCATELLE, R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. **Veterinary Microbiology**, v.58, p.239-249, 1997.

HENNESSY, K.J.; IANDOLO, J.I.; FENWICK, B.W. Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.5, p.1155-1159, 1993.

HUNNEMAN, W.A. Incidence, economic effects, and control of *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in pigs. **The Veterinary Quarterly**, v.8, n.1, p.83-87, 1986.

INZANA, T.J. Purification and partial characterization of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. **Infection and immunity**, v.55, n.7, p.1573-1579, 1987.

INZANA, T.J.; MATHISON, B. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. **Infection and immunity**, v.55, n.7, p.1580-1587, 1987.

INZANA, T.J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v.11, p.305-316, 1991.

INZANA, T.I.; TODD, J.; VEIT, H.P. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. **Infection and Immunity**, v.61, n.5, p.1682-1686, 1993.

JACOBSEN, M.J.; NIELSEN, J.P. Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. **Veterinary Microbiology**, v.47, p. 191-197, 1995.

JANSEN, R.; BRIAIRE, J.; KAMP, E.M.; GIELKENS, A.L.J.; SMITS, M.A. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.126, p.139-144, 1995.

JANSEN, R.; BRIAIRE, J.; SMITH, H.E.; DOM, P.; HAESEBROUCK, F.; KAMP, E.M.; GIELKENS, A.L.J.; SMITS, M.A. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. **Infection and Immunity**, v.63, n.1, p.27-37, 1995.

KAMP, E.M.; POPMA, J.K.; ANAKOTTA, J.; SMITS, M.A. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v.59, n.9, p.3079-3085, 1991.

KAMP, E.M.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; van LEENGOED, L.A.M.G.; SMITS, M.A. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. **Infection and Immunity**, v.65, n.10, p.4350-4354, 1997.

KICH, J.D. Validação a campo e determinação de amostragem para o teste de ELISA polivalente para *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipos 3, 5 e 7. Avaliação de métodos, locais de isolamento e classificação de amostras NAD-dependentes do trato respiratório superior de suínos portadores sadios. Porto Alegre, 1996. **Dissertação de Mestrado**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

KICH, J.D.; PIFFER, I.A.; BARCELLOS, D.E.S.N.; GUIDONI, A.L.; KLEIN, C.S.; FÁVERO, M.B.B.; VIZOTTO, R. Comparação de métodos de isolamento de bactérias NAD-dependentes do trato respiratório superior de suínos sadios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.1, p.1-6, 2000.

KICH, J.D.; PONTES, A.P. Análise atual das doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **RESUMOS**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.58-67.

KIELSTEIN, P.; WUTHE, H.H.; ANGEN, O.; MUTTERS, R.; AHRENS, P. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenic importance. **Veterinary Microbiology**, v.81, p.243-255, 2001.

KLEIN, C.S. Cápsula e superóxido dismutase como fatores de virulência em *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Porto Alegre, 2000. **Dissertação de Mestrado**, apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Centro de Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

KUME, K.; NAKAI, T.; SAWATA, A. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.46, n.5, p.641-647, 1984.

LO, T.M.; WARD, C.K.; INZANA, T.J. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.6, p.1704-1710, 1998.

MacINNES, J.I. & ROSENDAL, S. Analysis of major antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. **Infection and Immunity**, v.55, n.7, p.1626-1634, 1987.

MADEC, F. Enzootic respiratory diseases in the growing-finishing pig and control: a compound problem and still a challenge. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **RESUMOS**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. v.1, p.48-57.

MARTINS, C. Fatores e perspectivas na oferta e demanda da carne suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **RESUMOS**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p.53-61.

MICHELI, M.R.; BOVA, R.; CALISSANO, P.; D'AMBROSIO, E. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. **BioTechniques**, v.15, n.3, p.388-390, 1993.

MICHELI, M.R.; BOVA, R.; PASCALE, E.; D'AMBROSIO, E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.10, p.1921-1922, 1994.

MITTAL, K.R. Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.179-184, 1993.

MOLLER, K.; KILIAN, M. V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.12, p.2711-2716, 1990.

MOLLER, K.; FUSSING, V.; GRIMONT, P.A.D.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; KILIAN, M. *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., three new V factor-dependent species from the respiratory tract of pigs. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, n.4, p.951-956, 1996.

- MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L. The value of different serological tests in serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.41, n.3, p.247-253, 1994.
- MORES, N.; SOUZA, J.C.de A.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental da pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). 1- Patogenicidade e evolução das lesões anátomo-patológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, n6, p.679-693, 1984.
- MORAL, C.H.; SORIANO, A.C.; SALAZAR, M.S.; MARCOS, J.Y.; RAMOS, S.S.; CARRASCO, G.N. Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.5, p.1575-1578, 1999.
- MURALIDHARAN, K.; WAKELAND, E.K. Concentrations of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. **BioTechniques**, v.14, n.3, p.362-364, 1993.
- MYERS, L.E.; SILVA, S.V.P.S.; PROCUNIER, J.D.; LITTLE, P.B. Genomic fingerprinting of "*Haemophilus somnus*" isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.3, p.512-517, 1993.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, n.10, p.5269-5273, 1979.
- NEGRETE-ABASCAL, E.; TENORIO, V.; GARCIA, C.; GODÍNEZ, D.; SERRANO, J. de J.; de la CUADRA, J.A.; de la GARZA, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: virulence and gene cloning. **Archives of Medical Research**, v.25, n.2, p.229-233, 1994.
- NEGRETE-ABASCAL, E.; GARCÍA, R.M.; REYES, M.E.; GODÍNEZ, D.; de la GARZA, M. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.191, p.109-113, 2000.
- NICOLET, J. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de *Haemophilus paraahaemolyticus*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, v.216, p.487-495, 1971.
- NICOLET, J. Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.578-580, 1988.
- NICOLET, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, J.D. **Diseases of swine**. Iowa: Wolfe, 1992. Cap. 31. p.401-408.

NIELSEN, R.; O'CONNOR, P.J. Serology characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.25, p.96-106, 1984.

NIELSEN, R. Serology characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.26, p.501-515, 1985.

NIELSEN, R. Serology of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, p.41-58, 1986a.

NIELSEN, R. Serology characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, p.453-455, 1986b.

NIELSEN, R. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.580-582, 1988.

NOYES, E.P.; FEENEY, D.A.; PIJOAN, C. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, n.8, p.1025-1029, 1990.

OSTAAIJEN, J.V.; FREY, J.; ROSENDAL, S.; MacINNES, J.I. *Actinobacillus suis* isolated from healthy and diseased swine are clonal and carry *apxICABD* var. suis and *apxIIICA* var. suis genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1131-1137, 1997.

PAJU, S.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; FIVES-TAYLOR, P.; ASIKAINEN, S. Characterization of serologically nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.2019-2022, 1998.

PARK, Y.H.; KOHEL, R.J. Effect of concentration of MgCl₂ on random-amplified DNA polymorphism. **BioTechniques**, v.16, n.4, p.652-655, 1994.

PERRY, M.B.; ALTMAN, E.; BRISSON, J.R.; BEYNON, L.M.; RICHARDS, J.C. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Diseases**, v.4, p.299-308, 1990.

PIFFER, I.A.; FREITAS, A.R.; MUNARO, N.M.; SONCINI, R.A. Efeito das afecções pulmonares observadas no abate sobre o desenvolvimento dos suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2., 1985, Rio de

Janeiro. **RESUMOS**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1985. p.105-106.

PIFFER, I.A.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; BARCELLOS, D.E.S.N. Sorotipos de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolados no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.3, p.79-83, 1987.

PIFFER, I.A.; SONCINI, R.A.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOBESTIANSKY, J. Imunoprofilaxia da pleuropneumonia suína com vacina inativada de *Haemophilus pleuropneumoniae*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.6, n.3, p.67-72, 1986.

PIFFER, I.A.; KLEIN, C.; FÁVERO, M.; FIGUEIREDO, J.O. Caracterização bioquímica e sorológica de amostras de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isoladas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.1, p.123-129, 1997.

PIFFER, I.A.; FÁVERO, M.B.; KLEIN, C.S.; MORÉS, N.; VIZZOTO, R. Comparação entre o isolamento bacteriológico tradicional (IBT) e o método de separação imunomagnética (SIM) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), sorotipo 5B, de tonsilas de leitões cronicamente infectados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **RESUMOS**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. v.2, p.21-22.

PIJOAN, C.; MORRISON, R.B.; HILLEY, H.D. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.1, p.143-145, 1983.

PLOMGAARD, J. Eradication of respiratory diseases from the swine herd without depopulation. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **RESUMOS**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p.113-118.

POHL, S.; BERTOCHINGER, H.V.; FREDERIKSEN, W.; MANNHEIN, W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica-like* organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, p.510-514, 1983.

PREUS, H.R.; HARASZTHY, V.I.; ZAMBON, J.J.; GENCO, R.J. Differentiation of strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.10, p.2773-2776, 1993.

PROTAS, J.F.da S.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; PIFFER, I.A. Custo de um surto de pleuropneumonia suína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.2, p.241-244, 1985.

de la PUENTE-REDONDO, V.A.; del BLANCO, N.G.; GUTIERREZ-MARTIN, C.B.; MENDEZ, J.N.; RODRIGUEZ, E.F.F. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. **Research in Microbiology**, v.151, n.8, p. 669-681, 2000.

RAPP, V.J.; ROSS, R.F.; YOUNG, T.F. Characterization of *Haemophilus spp.* isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of complement-fixing antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus* Taxon "Minor Group". **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.6, p.945-950, 1985.

RAPP, V.J.; ROSS, R.F. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. **Infection and Immunity**, v.54, n.3, p.751-760, 1986.

ROSENDAL, S.; BOYD, D.A. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.5, p.840-843, 1982.

RYCHLÍK, I.; BARTOS, M.; SESTÁK, K. Use of DNA fingerprinting for accurate typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinární Medicina**, v.39, n.4, p.167-174, 1994.

SAARELA, M.; ASIKAINEN, S.; CHEN, C.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J. Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction and ribotyping for subtyping *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Anaerobe**, v.1, p.97-102, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbour, 1989. 3v.

SAVOYE, C.; JOBERT, J.L.; BERTHELOT-HÉRAULT, F.; KERIBIN, A.M.; CARIOLET, R.; MORVAN, H.; MADEC, F.; KOBISCH, M. A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.337-347, 2000.

SCHALLER, A.; KUHN, R.; KUHNERT, P.; NICOLET, J.; ANDERSON, T.J.; MacINNES, J.I.; SEGERS, R.P.A.M.; FREY, J. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbiology**, v.145, p.2105-2116, 1999.

SEBUNYA, T.N.K.; SAUNDERS, J.R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.182, n.12, p.1331-1334, 1983.

SHOPE, R.E. Porcine contagious pleuropneumonia. I- Experimental transmission, etiology and pathology. **Journal of Experimental Medicine**, n.119, p.357-368, 1964.

SILVA, A.F.; PAGANINI, F.J.; ACOSTA, J.C.; ROCHA, P.H.; MISTURA, H.; MARCON, E.; SIMON, V.A.; CASAGRANDE, H.A.; FLOSS, J.M. Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I- Estudo do perfil de doenças respiratórias nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **RESUMOS**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. v.2, p.31-32.

SIROIS, M.; LEMIRE, E.G.; LEVESQUE, R.C. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.6, p.1183-1187, 1991.

SOBESTIANSKY, J.; DALLA COSTA, O.A.; MORES, N.; BARIONI, W.; PIFFER, I.A.; PEDROSO DE PAIVA, D. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias: prevalência de rinite atrófica e de pneumonia nas fases de crescimento e terminação na região Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **RESUMOS**. Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999, p.171-172.

STEVENSON, G.W. Bacterial pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. **PROCEEDINGS**. Birmingham: International Pig Veterinary Society, 1998, p.11-20.

STRAW, B.E.; TUOVINEN, V.K.; BIGRAS-POULIN, M. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.12, p.1702-1706, 1989.

TAYLOR, G.T. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. **PCR: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1993. p.15-16.

TAYLOR, D.J. **Diseases of swine**. 8.ed. Ames:Iowa State University Press, 1999, p.913-940: *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8 ed. New York: Cornell University Press, 1992. Cap.8: The Genus *Haemophilus*: p.92-94.

TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of

representative bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.2, p.339-346, 1997.

VENUGOPAL, G.; MOHAPATRA, S.; SALO, D.; MOHAPATRA, S. Multiple mismatch annealing: basis for random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.197, n.3, p.1382-1387, 1993.

VIOLA, E.A.; BARTELS, H. Perspectivas da assistência técnica e extensão rural. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6., 1993, Goiânia. **RESUMOS**. Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1993. p.39-42.

WARDS, B.J.; JOYCE, M.A.; CARMAN, M.; HILBINK, F.; de LISLE, G.W. Restriction endonuclease analysis and plasmid profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 strains. **Veterinary Microbiology**, v.59, p.175-181, 1998.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.19, p.5275-5279, 1991.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v.218, 704-740, 1993.

YU, K.; PAULS, K.P. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.10, p.2606, 1992.

ZIZLAVSKY, M.; PASEKA, A.; STEKL, J.; BARTOS, M. The costs of respiratory apparatus diseases in pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16, 2000, Melbourne. **PROCEEDINGS**. Melbourne: International Pig Veterinary Society, 2000, p.153.