

**KARINA KOERICH DE SOUZA**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)  
BASEADO NO GENE *cpx* DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EM SUÍNOS  
EXPERIMENTALMENTE E NATURALMENTE INFECTADOS**

**CURITIBA**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**KARINA KOERICH DE SOUZA**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)  
BASEADO NO GENE *cpx* DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EM SUÍNOS  
EXPERIMENTALMENTE E NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
graduação em Ciências Veterinárias, Setor de  
Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton

**CURITIBA  
2005**

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária KARINA KOERICH DE SOUZA após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

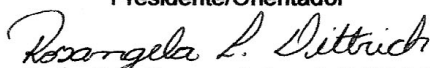
- 1) A Dissertação, intitulada “**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) BASEADO NO GENE *cpx* DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EM SUÍNOS EXPERIMENTAMENTE E NATURALMENTE INFECTADOS**” foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata apresentou-se muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou a candidata APROVADA concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 08 de abril de 2005.



Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton  
Presidente/Orientador



Profa. Dra. Rosângela Locatelli Dittrich  
Membro



Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais, por sempre terem acreditado em mim, pelo apoio incentivo, carinho e compreensão.*

*Aos meus irmãos, Alessandra e Fernando, pelo carinho e apoio.*

*Ao meu orientador Geraldo Alberton pela amizade, atenção, auxílio e dedicação durante todo o período de realização do mestrado.*

*À Jalusa Deon Kich pela paciência, amizade e ensinamentos transmitidos durante a minha permanência no laboratório.*

*À Cátia, pelo suporte dado ao desenvolvimento deste trabalho.*

*Às colegas de mestrado, Mariza e Lillian, pelo carinho, amizade e auxílio durante a minha permanência em Curitiba.*

*Às amigas Suzana e Lana pelo incentivo e apoio em todos os momentos.*

*Ao Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, pela oportunidade de realizar o projeto de mestrado.*

*Ao pessoal do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, pela acolhida e atenção, que colaboraram com a execução do projeto de mestrado e, em especial, aos amigos Marni, Édio e Vizzotto, não somente pelos ensinamentos, mas pela grande amizade.*

*A todos que direta ou indiretamente colaboraram com minha formação.*

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de tabelas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Geral:.....	17
2. Específicos:.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Pleuropneumonia suína.....	18
3.2 Etiologia da pleuropneumonia.....	20
3.3 Epidemiologia.....	22
3.4 Fatores de virulência.....	23
3.5 Sinais clínicos.....	25
3.6 Isolamento do agente.....	26
3.7 Técnicas utilizadas na identificação e detecção de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Otimização das condições de PCR para o gene <i>cpx</i> de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	36
4.1.1 Temperatura de anelamento dos <i>primers</i> .....	36
4.1.2 Adição da <i>Platinum® Taq Antibody</i> nas reações de PCR <i>cpx</i> .....	37
4.1.3. PCR para gene <i>cpx</i> de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	38
4.1.4. Detecção do produto amplificado.....	39
4.1.5 Padronização das Unidades Formadoras de Colônia da amostra.....	39
4.1.6 Teste de especificidade.....	40
4.2 Inoculação experimental com <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	41
4.2.1 Preparação do inóculo.....	41
4.2.2 Procedimento e técnica de inoculação.....	41
4.2.3 Colheita e processamento do material.....	42
4.3 Avaliação da influência do tecido tonsilar na sensibilidade do teste de PCR <i>cpx</i> .....	42
4.3.1 Delineamento experimental.....	43
4.3.2 Processamento laboratorial.....	43
4.4 Validação do teste de PCR <i>cpx</i> em amostras clínicas provenientes de rebanhos.....	44
4.5 Sequenciamento do produto amplificado pela PCR <i>cpx</i> .....	45
4.6 Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Otimização das condições de PCR para o gene <i>cpx</i> de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	47
5.1.1 Temperatura de anelamento dos <i>primers</i> .....	47
5.1.2 Adição de <i>Platinum® Taq Antibody</i> nas reações de PCR.....	48
5.1.3 Limiar de detecção.....	48
5.1.4 Teste de especificidade.....	49
5.2 Inoculação experimental com <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	50
5.3 Avaliação da influência do tecido tonsilar na sensibilidade da PCR <i>cpx</i> .....	51
5.4 Validação do teste de PCR <i>cpx</i> em amostras clínicas provenientes de rebanhos.....	52

5.4.1 Isolamento bacteriológico tradicional .....	52
5.4.2. Teste de PCR <sub>cpx</sub> .....	53
5.4.3 Perfil sorológico .....	53
5.5 Sequenciamento do produto amplificado pela PCR <sub>cpx</sub> .....	55
6. DISCUSSÃO .....	56
7. CONCLUSÕES .....	63
8. BIBLIOGRAFIA .....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antígeno somático e capsular referente a cada sorotipo de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> pertencente ao biótipo I.....	21
Tabela 2 - Características, tamanho e sorotipos referentes às toxinas do <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	24
Tabela 3 - Amostras de referência dos sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	37
Tabela 4 - Componentes da reação de PCR para amplificação do DNA de <i>A. pleuropneumoniae</i> com respectivos volumes e concentrações.....	38
Tabela 5 - Amostras bacterianas utilizadas nos teste de especificidade da PCR <sub>cpx</sub> .....	40
Tabela 6 - Número de amostras positivas na PCR <sub>cpx</sub> provenientes de três leitões inoculados com <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipo 5b e um leitão mantido em contato conforme material coletado e meio de transporte .....	51
Tabela 7 - Resultados obtidos pelo método da PCR <sub>cpx</sub> na detecção do <i>A. Pleuropneumoniae</i> em diferentes diluições bacterianas e porções de tecido tonsilar .....	52
Tabela 8 - Amostras positivas pela PCR <sub>cpx</sub> na detecção do <i>A. pleuropneumoniae</i> em suínos de diferentes idades provenientes de três rebanhos com diferentes status sanitários quanto à apresentação clínica da pleuropneumonia suína .....	53



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> com temperatura de anelamento de 55°C em amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*. (M) Marcador de peso molecular (100 pb); (1) Sorotipo 1; (2) Sorotipo 2; (3) Sorotipo 3; (4) Sorotipo 4; (5) Sorotipo 5; (6) Sorotipo 6; (7) Sorotipo 7; (8) Sorotipo 8; (9) Sorotipo 9; (10) Sorotipo 10; (11) Sorotipo 11; (12) Sorotipo 12 e (13) controle negativo.....47

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> com temperatura de anelamento de 57°C em amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*. (M) Marcador de peso molecular (100 pb); (1) Sorotipo 1; (2) Sorotipo 2; (3) Sorotipo 3; (4) Sorotipo 4; (5) Sorotipo 5a; (6) Sorotipo 5b; (7) Sorotipo 6; (8) Sorotipo 7; (9) Sorotipo 8; (10) Sorotipo 9; (11) Sorotipo 10; (12) Sorotipo 11; (13) Sorotipo 12; (14) controle positivo (*A. pleuropneumoniae*) e (15) controle negativo .....47

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> em amostras biológicas (tecido tonsilar) contaminadas com *A. pleuropneumoniae*. (M) Marcador de peso molecular (100 pb); (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) amostras biológicas sem adição de *Platinum®Taq Antibody* na reação de PCR; (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14) amostras biológicas com adição de *Platinum®Taq Antibody* na reação de PCR; (15 e 16) controles positivos (*A. pleuropneumoniae*); (17 e 18) controles negativos .....48

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> na detecção do *A. pleuropneumoniae* em diluições bacterianas seriadas para análise do limiar de detecção. (M) Marcador; (1) diluição 10<sup>-1</sup>; (2) diluição 10<sup>-2</sup>; (3) diluição 10<sup>-3</sup>; (4) diluição 10<sup>-4</sup>; (5) diluição 10<sup>-5</sup>; (6) diluição 10<sup>-6</sup>; (7) diluição 10<sup>-7</sup>; (8) diluição 10<sup>-8</sup>; (9) diluição 10<sup>-9</sup>; (10) diluição 10<sup>-10</sup>; (11) diluição 10<sup>-11</sup>; (12) diluição 10<sup>-12</sup>; (13) controle positivo (*A. pleuropneumoniae*) e (14) controle negativo .....49

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> na detecção do *A. pleuropneumoniae*. (M) Marcador; (1) *Actinobacillus indolicus*; (2) *Actinobacillus minor* (6985); (3) *Actinobacillus minor* (7000); (4) *Actinobacillus porcinus*; (5) *Actinobacillus suis*; (6) *Bordetella bronchiseptica*; (7) *Haemophilus parasuis*; (8) *Haemophilus porcinus*; (9) *Pasteurella multocida*; (10) *Staphylococcus aureus*; (11) *Streptococcus suis*; (12) controle positivo (*A. pleuropneumoniae*) e (13) controle negativo .....50

Figura 6 - Percentual de amostras positivas obtidas no teste de ELISA e PCR<sub>cpx</sub> na detecção da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* aplicados em 100 suínos de diferentes idades pertencentes ao rebanho com infecção recente .....53

Figura 7 - Percentual de amostras positivas obtidas no teste de ELISA e PCR<sub>cpx</sub> na detecção da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* aplicados em 82 suínos de diferentes idades pertencentes ao rebanho com infecção antiga .....54

Figura 8 - Percentual de amostras positivas obtidas no teste de ELISA e PCR<sub>cpx</sub> na detecção da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* aplicados em 100 suínos de diferentes idades pertencentes ao rebanho sem apresentação clínica da doença .....54

Figura 9 - Alinhamento de parte da sequência de nucleotídeos dos genes *cpxCB* do operon *cpx* (*Genbank* nº U36397) que codifica proteínas de transporte de cápsula de *A. pleuropneumoniae* com a sequência de nucleotídeos da amostra amplificada proveniente do rebanho com infecção antiga (Santa Catarina, Brasil, 2004) .....55

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Apx	exotoxina de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
aroA	gene responsável pela biossíntese de ácido fólico e aminoácidos aromáticos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAMP	<i>Christie, Atkins, Munch-Peterson Test</i>
CNPISA	Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves
Co <sub>2</sub>	dióxido de carbono
cps	Gene responsável pela biossíntese de polissacarídeos capsulares
cpx	Gene responsável pelo transporte de cápsula
CVLB	cristal violeta, lincomicina e bacitracina
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfatado
DO	Densidade Óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético; sal dissódico
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GRSC	Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas
HCl	ácido clorídrico
IN	Instrução Normativa
kDa	kilodalton
LB	Lincomicina Bacitracina
LPS	Lipopolissacarídeos
LPS-CL	lipopolissacarídeos de cadeia longa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
NAD	nicotimamida-adenina-dinucleotídeo
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-PCR	<i>Nested</i> PCR
<i>omlA</i>	gene codificante da proteína externa de membrana
OMP	proteína externa de membrana
pb	par de bases
PBS	solução fosfato salina
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PCR <sub><i>cpx</i></sub>	reação em cadeia da polimerase para genes <i>cpx</i> de <i>A. pleuropneumoniae</i>
pH	potencial de hidrogênio
pmol	picomolar
PPLO	ágar para microrganismos similares ao da pleuropneumonia
rpm	rotações por minuto
RTX	<i>repeat toxins</i> (toxinas com repetições)
SDA	Secretaria de Defesa Sanitária
SPF	<i>System Pathogen Free</i>
TEB	EDTA 2 mM, tris-bórico 89 mM, pH 8,3
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
UFC	unidade formadora de colônia
μ	micrometro
μg	micrograma

$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
10 X	10 vezes a concentração de uso
20 X	20 vezes a concentração de uso

## RESUMO

O *Actinobacillus pleuropneumoniae* é o agente causador da pleuropneumonia suína, doença altamente infecciosa que provoca lesões graves no pulmão e pleura e causa elevadas perdas econômicas na indústria. Suínos com a infecção na forma assintomática ou crônica se tornam portadores e principais fontes de disseminação do agente. Para evitar a disseminação e minimizar o impacto econômico da doença é necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos sensíveis e específicos para identificação da infecção por *A. pleuropneumoniae*, alcançado com o uso de técnicas moleculares, como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O presente estudo teve como objetivo a padronização e a validação da técnica de PCR para o gene responsável pelo transporte de cápsula (*cpx*) do *A. pleuropneumoniae*. Quatro leitões provenientes do sistema SPF foram inoculados experimentalmente com amostra de referência do *A. pleuropneumoniae*. Biopsias e suabes de tonsila foram realizados para a padronização da técnica de PCR *cpx* em animais sabidamente positivos e para observar por quanto tempo era possível detectar o *A. pleuropneumoniae*. Paralelamente foi realizado um experimento para verificar o efeito negativo do tecido tonsilar sobre os resultados da PCR. Para isso, porções de tonsila de animais negativos para o *A. pleuropneumoniae* foram contaminadas artificialmente com o *A. pleuropneumoniae*. Para a validação da técnica da PCR a mesma foi empregada em amostras oriundas de três rebanhos com diferentes *status* sanitários quanto à apresentação clínica da pleuropneumonia. A PCR demonstrou alta especificidade na detecção do agente e maior sensibilidade quando comparada ao isolamento bacteriológico tradicional. Foi observado efeito negativo do tecido tonsilar sobre os resultados da PCR e não houve isolamento da bactéria em nenhum dos rebanhos testados.

## ABSTRACT

The *Actinobacillus pleuropneumoniae* is the etiological agent of porcine pleuropneumonia, highly infectious disease that causes serious injuries in the lung and pleura, and causes severe economic losses to the swine industry. Swine with asymptomatic and chronic infection are carriers and the main origins of bacteria dissemination. To avoid the dissemination and minimize the economic impact of disease is necessary the development of sensitivity and specificity diagnostic methods for identification the infection by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, achieved with the use of molecular techniques, as the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The present study purposed the standardization and validation of the PCR technique based in gene of capsule transport (*cpx*) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Four piglets from SPF herds were experimental inoculated with standard sample of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tonsillar biopsies and swabs were taken for PCR *cpx* technique padronization in positives animals and to observe the possible period to detect the *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Parallely, an experiment was realized to check the negative effect of tonsillar tissue on PCR results. That is, tonsillar portion of pigs free from infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* were artificial contaminated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotype 5b. For PCR technique validation, it was used in samples of three herds with different sanitary status as for clinic presentation of pleuropneumonia. The PCR showed high specificity in the agent detection and more sensitive than traditional bacteriologic isolation. It was observed negative effect of tonsillar tissue on PCR reactions and there was no isolation of the bacteria from the tested herds.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos cinco anos, a produção de suínos apresentou um crescimento de 15% ao ano (BOHRER, 2003). O crescimento da produção deve manter assegurada a sanidade do rebanho objetivando a qualidade e segurança dos produtos derivados de suínos, cumprindo com a exigência do mercado consumidor. Estas características são essenciais para a consolidação da suinocultura brasileira, já que, entre as principais restrições impostas ao Brasil, direcionadas à exportação da carne suína, estão os problemas sanitários do rebanho, representados principalmente pelas doenças respiratórias e entéricas (PORKWORD, 2002).

Com a criação intensiva, principalmente nas regiões sul e sudeste, aumentou a ocorrência de doenças respiratórias em todos os criatórios de suínos e, conseqüentemente, o custo da produção. Entre as principais doenças respiratórias dos suínos, a pleuropneumonia suína é uma das mais importantes doenças bacterianas estando presente em todos os países suinocultores e responsável por grandes perdas econômicas e sérios prejuízos nos sistemas de criação (TAYLOR, 1999).

A pleuropneumonia suína é uma doença infecto-contagiosa causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* a qual ocasiona lesões graves no pulmão e pleura. O agente é transmitido por via respiratória, entre baias adjacentes ou pelo contato direto entre animais, sendo considerada uma doença altamente contagiosa. A severidade depende da virulência bacteriana e do estado imunológico do rebanho (FENWICK e HENRY, 1994).



Entre as perdas econômicas causadas pelo pleuropneumonia estão relacionadas atraso no desenvolvimento, piora na conversão alimentar, custos com medicamentos, aproveitamento condicional e condenação de carcaças no abatedouro (TAYLOR, 1999). Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos, sensíveis e espécie-específicos para rápida identificação do agente causador desta doença, minimizando o impacto econômico e permitindo a implantação de programas sanitários visando seu controle (CHOE e CHAE, 2001).

A utilização de técnicas rápidas e precisas, como métodos moleculares baseados em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vem se tornando fundamental na detecção do *A. pleuropneumoniae*, já que todos os métodos existentes para diagnóstico apresentam limitações. A PCR tem permitido grande evolução nas análises de rotina em laboratórios de diagnóstico, principalmente pela alta especificidade, sensibilidade e versatilidade (GRAM e AHRENS, 1998).

A PCR baseada no gene responsável pelo transporte de cápsula (gene *cpx*) do *A. pleuropneumoniae* tem se tornado uma boa alternativa no diagnóstico da pleuropneumonia nos casos de infecção assintomática ou crônica. Nestes casos os animais não apresentam sinais clínicos característicos da doença, mas tornam-se portadores e os principais responsáveis pela disseminação do agente. Nestes casos, onde o isolamento da bactéria é mais difícil pela influência de outras espécies bacterianas presentes nas tonsilas e pelo pouco número de *A. pleuropneumoniae* presente, a PCR demonstrou ser mais sensível na detecção do agente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral:

- ✓ Otimizar a técnica de PCR para o gene *cpx* de *A. pleuropneumoniae* em amostras clínicas oriundas de animais com presença ou ausência de sinais clínicos da pleuropneumonia.

### 2. Específicos:

- ✓ Padronizar a técnica de PCR em amostras de referência permitindo a precisa identificação e detecção do *A. pleuropneumoniae*;
- ✓ Testar a sensibilidade e especificidade do teste PCR<sub>cpx</sub>;
- ✓ Avaliação da influência do tecido tonsilar na sensibilidade do teste de PCR;
- ✓ Testar a técnica de PCR<sub>cpx</sub> em animais inoculados;
- ✓ Aplicar a técnica em amostras de *A. pleuropneumoniae* isoladas de campo provenientes de suínos infectados;
- ✓ Validar a técnica em amostras colhidas de granjas com presença ou ausência de sinais clínicos de pleuropneumonia suína.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Pleuropneumonia suína

A pleuropneumonia suína foi determinada como uma séria doença para suínos em 1970 (FENWICK e HENRY, 1994). É uma doença infecto-contagiosa específica dos suínos causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Afeta animais de todas as idades e causando lesões graves no pulmão e pleura. Suínos susceptíveis desenvolvem broncopneumonia necrótica aguda. As toxinas produzidas, juntamente com a resposta inflamatória, induzem rapidamente a necrose vascular focal resultando em edema, necrose isquêmica e pleurite fibrinosa (FENWICK e HENRY, 1994). A doença pode cursar com quadro superagudo, agudo, subagudo e crônico. As formas superaguda e aguda são caracterizadas pelo rápido aparecimento do quadro de pleuropneumonia exsudativa, fibrino-hemorrágica e necrótica (BERTRAM, 1985) com severo edema e inflamação, e na forma crônica, por aderências de pleura e pericárdio e focos de necrose pulmonar encapsulados (MORES et al., 1984). Na forma aguda, as lesões microscópicas são caracterizadas por edema, deposição de fibrina, infiltração por neutrófilos, linfócitos e macrófagos no parênquima pulmonar, septos interlobulares e interalveolares mais espessos e presença de sangue (BERTRAM, 1985; SHOPE, 1964). Em lesões crônicas há necrose do parênquima pulmonar e reação fibrótica (MORES et al, 1984).

As lesões decorrentes da pleuropneumonia são restritas à cavidade torácica, envolvendo pulmões, pleura e, com freqüência, pericárdio (MORES et al., 1984). As pneumonias são bilaterais e localizadas preferencialmente nos lobos diafragmáticos, distribuição dorsal, coloração vermelho escuro e aspecto friável. Animais com mais de 24 horas de infecção apresentam pericardite com deposição de fibrina e fluído no saco pericárdico (BERTRAM, 1985). Os animais que sobrevivem à infecção aguda de pleuropneumonia tornam-se portadores assintomáticos do agente, abrigando o *A. pleuropneumoniae* no trato respiratório, principalmente nas tonsilas e, menos freqüentemente, na cavidade nasal (NICOLET, 1992; SIDIBÉ et al., 1993).

A pleuropneumonia é transmitida por via respiratória e é considerada uma doença altamente contagiosa, pois o agente pode ser transmitido pelo ar entre baias adjacentes ou pelo contato direto entre os animais. A introdução de animais portadores em rebanhos livres da infecção constitui-se na principal fonte de disseminação da doença (SEBUNYA e SAUNDERS, 1983; INZANA, 1991). Em contraste com outras bactérias que causam pneumonia, não é necessária uma infecção primária para que o *A. pleuropneumoniae* cause doença nos suínos, mas pode contribuir na severidade do quadro clínico como resultado da redução na defesa do sistema respiratório (FENWICK e HENRY, 1994).

O primeiro surto de pleuropneumonia suína foi descrito por Mathew e Pattison (1961) na Inglaterra, seguido pelos Estados Unidos (ORLANDER, 1963) e Argentina (SHOPE, 1964), onde a doença foi melhor caracterizada. No Brasil, a pleuropneumonia foi registrada pela primeira vez por Locatelli et al. (1981) no estado de Santa Catarina, município de Chapecó, à partir de um surto com alta morbidade (70%). Desde então, vários surtos foram diagnosticados no país, devido à intensificação da produção de suínos (PIFFER, 1983), resultando em prejuízos econômicos na suinocultura, principalmente pela queda no desenvolvimento, piora na conversão alimentar, despesas com medicação, vacinação, serviços veterinários (HUNNEMAN, 1986) e condenação de carcaças no abatedouro (PIFFER et al., 1982).

A severidade da doença depende do estado imunitário do rebanho, número de organismos necessários para causar a doença clínica e virulência da cepa bacteriana (FENWICK e HENRY, 1994). Algumas práticas de manejo podem ser adotadas para minimizar os efeitos da doença como fornecer boas condições ambientais de temperatura e ventilação, evitar a superpopulação e a mistura de lotes no crescimento e na terminação, adotar um manejo adequado, aplicação de um programa de limpeza e desinfecção das instalações, vazios sanitários entre lotes (SOBESTIANSKY et al., 1999) e controle ou eliminação de doenças simultâneas (FENWICK e HENRY, 1994).

### 3.2 Etiologia da pleuropneumonia

O *A. pleuropneumoniae* pertence à família *Pasteurellaceae*, que inclui patógenos e membros da microbiota comensal dos animais, sendo constituída pelos gêneros *Pasteurella*, *Actinobacillus* e *Haemophilus* todos dependentes do fator V de crescimento (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – NAD) (MØLLER e KILIAN, 1990). Apresentam importância veterinária pelo aspecto de doença causada, rota de transmissão, fatores de virulência e fatores responsáveis pela proteção imunológica (FENWICK e HENRY, 1994).

O *A. pleuropneumoniae*, juntamente com *Haemophilus parasuis*, *A. minor*, *A. porcicus* e *A. indolicus* (MØLLER et al., 1996) são encontrados no trato respiratório superior dos suínos (PIFFER et al., 1997). Estudo realizado por Møller e Kilian (1990) demonstrou que o trato respiratório superior dos suínos abriga inúmeras espécies da família *Pasteurellaceae* fator V dependentes que são facilmente confundidas com espécies patogênicas.

O *A. pleuropneumoniae* é um cocobacilo Gram negativo, bactéria capsulada, anaeróbia facultativa, imóvel, não formadora de esporos e suas colônias produzem hemólise parcial em agar sangue denominada de zona  $\beta$ -hemolítica (SEBUNYA e SAUNDERS, 1983). Pode ser categorizado em 2 grupos baseados no fator V de crescimento: biotipo 1, na qual requer fator de crescimento ( $\beta$ -NAD-dependente) e biotipo 2,  $\beta$ -NAD-independente (POHL et al., 1983). Os sorotipos pertencentes ao biotipo 1 são mais virulentos quando comparados com o biotipo 2 (NICOLET, 1992; DOM e HAESEBROUCK, 1992).

O *A. pleuropneumoniae* é identificado bioquimicamente pela produção de hemólise em ágar sangue, teste de *Christie, Atkin, Munch-Peterson* (CAMP) positivo (sinergismo das hemolisinas com a  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus* em células sanguíneas), dependência do fator V, degradação da uréia (BIBERSTEIN et al., 1977) e fermentação de manitol, D-galactose e ribose. A bactéria não fermenta arabinose, inositol, melibiose, rafinose, sorbitol, threalose e ausência de hidrólise pela  $\alpha$ -fucosidase (MØLLER e KILIAN, 1990).

Os antígenos capsulares são responsáveis pela classificação dos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. Foram descritos 13 sorotipos pertencentes ao

biotipo 1 (tabela 1) os quais variam em relação à sua patogenicidade (FENWICK e HENRY, 1994; BLACKALL et al., 2000).

Tabela 1. Antígeno somático e capsular referente a cada sorotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pertencente ao biótipo I.

SOROTIPO/REFERÊNCIA	ANTÍGENO SOMÁTICO	ANTÍGENO CAPSULAR
1 (Nicolet, 1971)	1	1
2 (Nicolet, 1971)	2	2
3 (Nicolet, 1971)	3	3
4 (Gunnarson et al., 1977)	4	4
5 (Gunnarson et al., 1977)	5	5
6 (Gunnarson et al., 1977)	3	6
7 (Rosendal e Boyd, 1982)	4	7
8 (Nielsen e O'Connor, 1983)	3	8
9 (Nielsen, 1985)	1	9
10 (Nielsen, 1985)	6	10
11 (Nielsen, 1986)	1	11
12 (Nielsen, 1986)	7	12
15 (Blackall et al., 2002)	-	15

Fonte: adaptado de Nakai et al. (1992).

Reações cruzadas são observadas entre os diferentes sorotipos, devido à similaridade de antígenos somáticos (lipopolissacarídeos de cadeia longa - LPS-CL) (NICOLET, 1988). Esta diferença não é observada entre os sorotipos pertencentes ao biotipo 2 (FODOR et al., 1989).

### 3.3 Epidemiologia

O conhecimento da epidemiologia da infecção é necessário para prevenção e controle da doença, enquanto que o conhecimento do sorotipo prevalente no país é importante para estudo soropidemiológico. Uma razão desta é que o diagnóstico sorológico é tipo específico, ou seja, a resposta imune do animal depende do sorotipo responsável pela infecção (NIELSEN, 1988). Outra razão é que a imunidade vacinal é sorotipo-específica, sendo assim mais efetivas na redução da severidade da pleuropneumonia quando combinadas com os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* que causam a doença clínica. Isto ocorre pelo fato da imunidade induzida pela vacina ser primariamente direcionada a antígenos capsulares e lipopolissacarídeos (FENWICK e HENRY, 1994).

A distribuição mundial dos sorotipos e o comportamento dos mesmos variam de um país para outro, sendo que algumas cepas podem apresentar-se pouco virulentas em determinados continentes e epidêmicos em outras situações (NICOLET, 1992), mas há sorotipos predominantes em cada região geográfica (INZANA, 1991; NIELSEN, 1988). De acordo com Kich (2005)<sup>1</sup> os sorotipos 3, 5 e 6 são mais prevalentes no Brasil.

O agente geralmente é introduzido em rebanhos sem histórico clínico prévio da doença após a aquisição de animais infectados. Animais que se recuperam da doença podem tornar-se portadores, carreando o agente principalmente nas lesões pulmonares e/ou tonsilas e menos freqüente na cavidade nasal (NICOLET, 1992; SIDIBÉ et al., 1993), como ocorre nas infecções assintomáticas, situação em que bactéria não chega aos pulmões, mas persiste nas tonsilas ou cavidade nasal (GRAM et al., 1996; CHIERS et al., 2002), constituindo no mais importante meio de transmissão do agente entre rebanhos (FENWICK e HENRY, 1994; BOSSÉ et al., 2002). As conseqüências da introdução do agente dependem do estado imunológico do rebanho. Em rebanho onde a doença é enzoótica, com fatores ambientais adequados e adoção de bons procedimentos de manejo, as chances de desenvolvimento clínico da doença são remotas, ao contrário do que acontece em rebanhos livres de pleuropneumonia. Mas, mesmo em rebanhos

endemidamente infectados, qualquer mudança de manejo, ambiente ou fator animal que gere estresse e declínio da imunidade, pode desencadear a doença clínica severa (FENWICK e HENRY, 1994).

A prevalência da pleuropneumonia aumentou com a intensificação dos sistemas de produção em decorrência do aumento do nível de estresse e facilidade na transmissão do agente. Nestes sistemas modernos de produção, uma granja abriga animais de origem e idades diferentes, oferecendo a oportunidade da infecção endêmica tornar-se epizootica (FENWICK e HENRY, 1994).

### 3.4 Fatores de virulência

Vários fatores de virulência já foram descritos, sendo os principais: polissacarídeos capsulares (cápsula) (WARD e INZANA, 1994), exotoxinas (DOM et al., 1992), lipopolissacarídeos (LPS) (BÉLANGER et al., 1995) e proteínas de membrana (INZANA, 1991; HAESBROUCK et al., 1997). Alguns fatores de virulência podem ser sorotipo ou amostra específicas e expressadas somente em condições específicas de crescimento.

A severidade da infecção depende da quantidade de bactéria que infectou o suíno, das diferenças entre amostras pertencentes ao mesmo sorotipo e a presença de sorotipos menos virulentos (INZANA, 1991; FENWICK e HENRY, 1994).

A cápsula é considerada um importante fator de virulência devido à sua capacidade de impedir a Fixação do Complemento na parede Gram negativa (INZANA et al., 1988) devido a utilização do ácido siálico, impedindo a ativação da cascata do complemento, além de inibir a fagocitose (FENWICK e HENRY, 1994) pela secreção de toxinas letais aos macrófagos.

As exotoxinas são produzidas pela família *Pasteurellaceae* e são chamadas toxinas *Apx*, na qual contêm uma sequência repetida de nucleotídeos (FENWICK e HENRY, 1994). O *A. pleuropneumoniae* produz quatro diferentes toxinas: toxinas *ApxI*, *ApxII*, *ApxIII* (KAMP et al., 1991; FREY et al., 1993; JANSEN et al.,

---

<sup>1 1</sup> Comunicação Pessoal do Autor – Março de 2005.



1995) e *ApxIV* (SCHALLER et al., 1999). Segundo Tu et al. (1994) as exotoxinas possuem atividades hemolíticas e citotóxicas independentes (tabela 2).

Tabela 2. Características, tamanho e sorotipos referentes às exotoxinas do *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

TOXINAS	CARACTERÍSTICAS	TAMANHO	SOROTIPOS
ApxI	Fortemente hemolítica e citotóxica	105 kDa	1, 5, 9, 10 e 11.
ApxII	Fracamente hemolítica e moderadamente citotóxica	103-105 kDa	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 15.
ApxIII	Não-hemolítica e fortemente citotóxica	120 kDa	2, 3, 4, 6, 8 e 15.
ApxIV	Não-hemolítica	202 kDa	Todos do biótipo 1.

Fonte: Sobestiansky et al, (1999).

As exotoxinas são termoestáveis e são responsáveis pela forte reação imunológica (FREY e NICOLET, 1988), podendo ser utilizadas como componentes importantes na produção de vacinas para pleuropneumonia (FREY, 1995) e pelas severas lesões nos pulmões, como necrose e hemorragia (INZANA, 1991; KAMP et al., 1997), resultantes dos efeitos citotóxicos das toxinas *Apx* nas células alveolares. Segundo Frey (1995), há diferença no potencial de virulência entre os biotipos 1 e 2 de *A. pleuropneumoniae* em decorrência da expressão das toxinas, sendo o biótipo 2 menos virulento quando comparado ao biótipo 1.

Os sorotipos mais virulentos são os que produzem as toxinas ApxI e II (TÁSCON et al., 1994), responsáveis pelo desenvolvimento dos sinais clínicos e lesões pulmonares característicos da pleuropneumonia (KAMP et al., 1997), que incluem os sorotipos 1, 5, 9 e 11, e entre os sorotipos menos virulentos estão os sorotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 12 (INZANA, 1991). Segundo Reimer et al. (1995), a toxina ApxII em combinação com outro fator de virulência, sem ser outra toxina da família *Apx*, é suficiente para produzir lesões características da pleuropneumonia, no entanto, a presença da toxina ApxII, juntamente com ApxI, aumenta

consideravelmente a virulência e mortalidade dos suínos infectados, confirmando que a toxina Apxl é a toxina responsável pela severidade da doença.

Os lipopolissacarídeos são responsáveis pela inflamação aguda e intensificação das lesões, atuando juntamente com as toxinas (UDEZE et al., 1987) e são responsáveis pela adesão da bactéria nas células e mucosas do trato respiratório dos suínos (JACQUES e PARADIS, 1998). O LPS é o principal constituinte da membrana externa de bactérias Gram negativas, sendo compostos por polissacarídeos e lipídeo A, sendo este último considerado uma endotoxina (HAESEBROUCK et al., 1997), na qual apresenta forte atividade endotóxica que, juntamente com a alta sensibilidade dos suínos às exdotoxinas nas infecções por *A. pleuropneumoniae*, facilita à indução à pneumonia pela penetração no epitélio do trato respiratório (FENWICK et al., 1986).

As proteínas de membrana também são importantes fatores de virulência. Na membrana externa da parede celular do *A. pleuropneumoniae* estão presentes várias destas proteínas. Algumas proteínas apresentam considerável peso molecular e possuem importância antigênica, enquanto outras são menos importantes. A massa molecular das principais proteínas da membrana externa (OMP) é de 39 – 44 kDa. Os 13 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* apresentam uma proteína de membrana externa de 42 kDa. Anticorpos do soro de porcos convalescentes infectados com um certo sorotipo reagem às proteínas de membrana externa de todos os sorotipos (DOM et al., 1992).

### **3.5 Sinais clínicos**

Os suínos em crescimento são os mais severamente afetados, mas os animais susceptíveis imunologicamente podem desenvolver a doença. Os primeiros sinais clínicos aparecem rapidamente, incluindo anorexia, letargia e febre (FENWICK e HENRY, 1994).

A pleuropneumonia pode cursar com quadro superagudo, agudo, subagudo e crônico (SHOPE, 1964). Na forma superaguda da doença com inflamação do pulmão, pleura e pericárdio, os animais apresentam febre de 41,5°C, apatia, anorexia e freqüentemente diarréia, tosse, vômito, dispnéia, ataxia e manifestando

um severo quadro respiratório com tosse profunda e improdutiva, espirros e cianose (TAYLOR, 1999). Poucas doenças progridem tão rapidamente como a pleuropneumonia, podendo ocorrer a morte nas primeiras quatro horas após o surgimento clínico da doença (SHOPE, 1963; FENWICK e HENRY, 1994). Os animais, inclusive, podem ser encontrados mortos, sem prévia manifestação de sinais clínicos aparentes, com secreção sanguinolenta nas narinas e boca. Na forma aguda os animais apresentam febre de 40,5 à 41,0°C, dispnéia, tosse e anorexia. A morbidade nesta forma é geralmente alta, atingindo até 50% dos animais (FENWICK e HENRY, 1994). As formas subaguda e crônica cursam sem febre ou com febres de pouca intensidade e os principais sinais são redução no desenvolvimento zootécnico e tosse esporádica. A infecção superaguda e aguda normalmente resulta em infecção crônica (NICOLET, 1992).

### **3.6 Isolamento do agente**

O isolamento do agente da pleuropneumonia é fundamental para o diagnóstico definitivo da doença, mas o diagnóstico presuntivo pode ser feito baseado no histórico da doença, sinais clínicos e lesões observadas na necropsia (SOBESTIANSKY et al., 1999). O *A. pleuropneumoniae* pode ser isolado dos pulmões, tonsilas, secreções nasais dos animais infectados, bem como da cavidade nasal e tonsilas de suínos portadores assintomáticos (KICH et al., 2000), mas freqüentemente localizado nas lesões necróticas dos pulmões e nas tonsilas, e menos freqüente na cavidade nasal (SIDIBÉ et al., 1993). Segundo Fenwick (1990) o isolamento a partir de secreção nasal ocorre nos casos superagudos, pelo grande número de bactérias, não ocorrendo em casos crônicos. O isolamento bacteriológico tradicional, a partir de tonsilas, apresenta baixa sensibilidade, pois as tonsilas dos suínos são fortemente colonizadas com microbiota comensal, incluindo várias espécies bacterianas NAD dependentes como *A. minor*, *A. porcinus* e *A. indolicus*, na qual podem interferir negativamente no isolamento e detecção do *A. pleuropneumoniae* (JACOBSEN e NIELSEN, 1995; SIDIBÉ et al., 1993). Pela dificuldade de isolamento foram realizados estudos utilizando meios seletivos. Sidibé et al. (1993) obtiveram sucesso no isolamento utilizando meio de

cultivo que continha cristal violeta, lincomicina e bacitracina (CVLB), enquanto Jacobsen e Nielsen (1995) descreveram o ágar sangue suplementado com NAD, cristal violeta, lincomicina e bacitracina como melhor meio para isolamento do *A. pleuropneumoniae*. Em casos agudos é fácil o isolamento da bactéria pela semeadura direta em ágar sangue com estria perpendicular de *Staphylococcus aureus*, colônia fornecedora de NAD (BIBERSTEIN et al., 1977), enquanto que o isolamento é difícil em casos crônicos da doença.

Em muitas infecções assintomáticas os animais carregam a bactéria na cavidade nasal e tonsilas, não apresentando sinais clínicos da doença (GRAM et al., 1996; CHIERS et al., 2002), constituindo na forma mais importante de manutenção da infecção no rebanho e transmissão da doença (ROSENDAL e MITTCHELL, 1983). Estes animais não abrigam grande número de *A. pleuropneumoniae* nas tonsilas (FITTIPALDI et al., 2003), na qual juntamente com a influência da micorbiota do trato respiratório superior, torna o isolamento, pela cultura bacteriológica direta, difícil e demorada (SIDIBÉ et al., 1993).

Num estudo recente realizado por Gottschalk et al. (2003) foram analisadas duas amostras atípicas, inicialmente identificadas como *A. pleuropneumoniae*, devido às características bioquímicas e antigênicas similares. Utilizando-se métodos tradicionais de cultivo e identificação, as bactérias foram isoladas de tonsilas de suínos sem sinais clínicos, lesões e histórico clínico de pleuropneumonia. No entanto, obtiveram resultados negativos nos testes de PCR e apresentaram algumas diferenças quando comparadas com *A. pleuropneumoniae*, como não fermentação de manitol, não apresentação do gene da toxina ApxIV, que é um gene específico do *A. pleuropneumoniae*. A amostra não é virulenta e, em uma análise filogenética, a espécie foi separada em um grupo distinto das outras espécies de *Actinobacillus*, sendo denominada *A. porcitonillarum*.

A terapia antimicrobiana também interfere negativamente no isolamento em decorrência da susceptibilidade do *A. pleuropneumoniae* a muitos antibióticos de amplo-espectro utilizados na suinocultura (FEDORKA-CRAY et al., 1993) para reduzir a severidade da doença clínica (FENWICK e HENRY, 1994). Num estudo

realizado por Chiers et al. (1999), animais foram inoculados com *A. pleuropneumoniae* sorotipo 9, diretamente nas tonsilas, e medicados com antibiótico ceftiofur. Os animais não apresentaram sinais clínicos e lesões pulmonares, e não houve isolamento do agente a partir dos pulmões.

Kich et al. (2000) compararam três locais de colheita de material para isolamento de *A. pleuropneumoniae*, em leitões portadores assintomáticos, em três diferentes meios de cultivo: semeadura direta em meio sólido seletivo, diluição em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) enriquecido e seletivo e as mesmas diluições anteriores com semeadura em agar sangue com estria de *Staphylococcus aureus*. Foi colheitado suabe nasal, suabe de superfície tonsilar e fragmento de tonsila, sendo obtido melhor resultado no isolamento a utilização de fragmento de tonsila cultivado em meio sólido seletivo.

### **3.7 Técnicas utilizadas na identificação e detecção de *A. pleuropneumoniae***

Os testes sorológicos, além de serem utilizados para diagnóstico, servem como um guia para determinar o *status* imunológico do rebanho. Um pré-requisito para o uso destes testes é um equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, com possibilidade mínima de resultados falso-negativos e falso-positivos (NIELSEN, 1988). Vários testes diagnósticos baseados na detecção de anticorpos têm sido descritos na identificação da infecção por *A. pleuropneumoniae*, mas o teste de ELISA é o mais utilizado atualmente, pois permite que grande número de amostras sejam analisadas simultaneamente, apresenta facilidade na execução do teste e boa sensibilidade (GOTTSCHALK et al., 1994), porém apresenta menor especificidade quando comparada com as técnicas de biologia molecular.

Todos os testes apresentam limitações: o teste de Fixação de Complemento apresenta baixa sensibilidade (GOTTSCHALK, 2000) obtendo grande número de falso-negativos quando comparado com outros testes sorológicos, subestimando a prevalência da infecção (FENWICK e HENRY, 1994) além da dificuldade de realização, limitando seu uso (NIELSEN, 1988); teste de soroaglutinação e ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) superestimam a prevalência da infecção, pois obtêm grande número de resultados falso-positivos;

o teste de Inibição da Citolisina, apesar de não sofrer interferência da vacinação na interpretação dos resultados, é laborioso e apresenta custo elevado (FENWICK e HENRY, 1994). Alguns testes como a Imunodifusão e Hemaglutinação indireta não têm sido utilizadas devido à demora na sua execução (JESSING et al., 2003).

Alguns rebanhos de suínos podem apresentar sorologia positiva para *A. pleuropneumoniae*, mas não demonstrar sinais clínicos da doença (GAGNÉ et al., 1998). Nestes casos é possível que os rebanhos infectados apresentem ótimo *status* imunológico e tolerância à doença ou indica que a infecção ocorreu por amostras de baixa virulência, podendo tornar-se portador. Por outro lado, muitos animais apresentam sorologia negativa e carregam o *A. pleuropneumoniae* nas cavidades nasais e tonsilas, sem sinais clínicos, mostrando que o agente pode colonizar o trato respiratório superior sem indução da soroconversão (SIDIBÉ et al., 1993; CHIERS et al., 2002). Deste modo, o isolamento do agente é importante para confirmar a presença da infecção (GAGNÉ et al., 1998).

Segundo Ehrlich e Greenberg (1994) a avaliação sorológica é limitada por problemas como baixa especificidade, devido às reações cruzadas entre as espécies, e a dependência no desenvolvimento da resposta imune (soroconversão). Como as toxinas *Apx* são utilizadas no diagnóstico sorológico de *A. pleuropneumoniae*, a presença dos diferentes genes *apx* e a produção de *ApxI*, *ApxII* e *ApxIII* em várias espécies *Actinobacillus* não patogênicos, como *Actinobacillus suis* e *Actinobacillus rossii*, e outras espécies da família *Pasteurellaceae*, podem interferir severamente na determinação do *status* sorológico dos suínos e no diagnóstico da pleuropneumonia (SCHALLER et al., 2000). Além disso, os testes sorológicos não diferenciam animais infectados de animais vacinados ou imunizados, limitando seu uso como método diagnóstico (PIJOAN, 1993). Num estudo realizado por Dreyfus et al. (2004) no desenvolvimento e prevalidação do ELISA utilizando toxina *ApxIV* para sorodiagnóstico, os animais infectados naturalmente e experimentalmente soroconverteram para *ApxIV*, enquanto que animais sabidamente livres do *A. pleuropneumoniae* não mostraram reação sorológica para esta toxina, revelando a alta especificidade do teste quando comparado com testes baseados em toxinas

Apxl, II e III. Este teste apresentou alta especificidade, evitando reações cruzadas, e alta sensibilidade, detectando a infecção em animais sem sinais clínicos da doença e não reagiu positivamente na sorologia com animais vacinados.

Para Piffer e Guidoni (1997) os testes diagnósticos podem ser caracterizados como diretos e definitivos, quando envolvem o isolamento do agente, e indiretos e presuntivos, quando medem a resposta sorológica à presença do agente. Os testes presuntivos podem resultar em diagnósticos errôneos devido às reações imunes cruzadas com outros agentes ou não detectar animais recentemente infectados. Segundo Fenwick (1992) entre os testes sorológicos utilizados, os testes de ELISA e Inibição da Citolisina apresentam os melhores resultados no diagnóstico da pleuropneumonia.

A técnica de Separação Imunomagnética (SIM) vem se destacando por apresentar maior sensibilidade no isolamento do *A. pleuropneumoniae* em meios contaminados quando comparada a métodos tradicionais de isolamento (GAGNÉ et al., 1998; ANGEN et al., 2001). Num estudo realizado por Fittipaldi et al. (2003), a técnica de SIM foi mais sensível quando comparado com a técnica de PCR com amostras de DNA de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 sem cultura prévia. Apresenta a desvantagem de ser uma técnica bastante trabalhosa e sorotipo-específica, dificultando o diagnóstico, principalmente a campo.

Recentemente Gottschalk et al. (2003) isolaram uma bactéria inicialmente denominada *A. porcitonisillarum*, fenotípica e antigenicamente muito similar com o *A. pleuropneumoniae*, mas diferente geneticamente. Este fato pode complicar na interpretação dos resultados sorológicos, pois soroconverte para LPS e toxinas, com exceção da toxina ApxlIV (DREYFUS et al, 2004), e bacteriológicos, como no isolamento da bactéria pela técnica de SIM. A diferenciação com *A. pleuropneumoniae* só pode ser realizada com análise molecular, mas deve ser observado que o PCR para gene *dsb-like* resultou em reação positiva para *A. porcitonisillarum*, podendo comprometer a interpretação do resultado.

Nenhum teste diagnóstico imunológico e genético apresenta 100% de especificidade e sensibilidade e o uso combinado de testes pode ser preferível para melhor interpretação dos resultados (NIELSEN, 1988). O desenvolvimento de

métodos rápidos e acurados de diagnóstico é essencial para prevenção e controle da pleuropneumonia (CHO e CHAE, 2003). Técnicas moleculares para diagnóstico, como o método de PCR, muito utilizado para amplificação de DNA e RNA de uma variedade de agentes (SIROIS et al., 1991), são ferramentas promissoras para um rápido diagnóstico etiológico das pneumonias, oferecendo várias vantagens quando comparada com testes utilizados na rotina de laboratório (MURDOCH, 2003). A PCR detecta o agente patogênico sem depender da viabilidade do agente, detecta seqüências genéticas de quantidades pequenas de DNA, evita reações cruzadas, não necessita de cultura prévia para detecção (LO et al., 1998). A PCR é menos afetada pela terapia antimicrobiana, sendo que o *A. pleuropneumoniae* é susceptível a muitos antibióticos de amplo espectro (FEDORKA-CRAY et al., 1993).

A PCR apresenta maior sensibilidade quando comparada com métodos já descritos de isolamento, mas pode ser afetada pela presença de substâncias que podem interferir nos resultados do teste, na qual variam com o tipo de amostra testada e usualmente de origem desconhecida (WILSON, 1997). Este fato deve ser considerado na otimização da técnica para que sejam minimizados os resultados falso-negativos. Num estudo para desenvolver um PCR sensível e específico para detectar DNA de *A. pleuropneumoniae* sobre condições semelhantes das amostras clínicas, Sirois et al. (1991) confirmaram que o grande número de células bacterianas presentes (maior que  $10^6$ /mL) pode inibir a PCR, como já foi observado por Barry et al. (1990). A reação de PCR também pode ser prejudicada por produtos que inibam a atividade da DNA polimerase, atividade de DNase's, incompleta extração do DNA da bactéria (GRAM et al., 1996) ou DNA de outras bactérias (FITTIPALDI et al., 2003).

O risco de resultado falso-positivo é o maior problema dos testes de PCR, podendo ser resultante dos altos níveis de outros organismos na amostra ou resultado da amplificação de microorganismos que apresentam seqüência do genoma similar ao organismo alvo (MURDOCH, 2003).

A PCR é um método que consiste na síntese enzimática *in vitro* de seqüências de DNA pelo uso de *primers* que hibridizam na fita complementar do



DNA do gene alvo. Uma série de ciclos repetidos que consistem de desnaturação da fita *template*, anelamento dos *primers* e extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase termoestável, resulta em acúmulo exponencial do fragmento de interesse. Após certo número de ciclos, a amplificação do fragmento acumulado termina, entrando na fase estacionária chamada *plateau*, na qual depende do número de cópias da fita original de DNA presente na amostra e da quantidade total de DNA sintetizado. A técnica de PCR apresenta alta especificidade para detectar seqüências alvos de DNA elevando a probabilidade de detectar seqüências raras pelo uso de *primers* específicos para genes de cada microorganismo. Alguns fatores podem afetar a especificidade da reação de amplificação como temperatura de anelamento, tempo de incubação durante o anelamento, concentração de *primers* e enzima e a concentração de íons de magnésio, necessário para a atividade enzimática da polimerase (ERLICH, 1989).

Gram e Ahrens (1998) e Savoye et al. (2000) utilizaram o gene *omlA* (responsável pela produção das proteínas de membrana) para detecção e identificação do agente em infecções assintomáticas. O gene *omlA* está presente em todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* pertencentes ao biotipo 1, mas diferenças na região média do gene permitiu a divisão dos sorotipos em 5 grupos: 1, 9, 11 e 12 (grupo 1); 2 e 8 (grupo 2); 3, 6, e 7 (grupo 3); 4 (grupo 4) e 5a, 5b e 10 (grupo 5) (GRAM et al., 2000). Este gene forma grupos característicos de sorotipos, indicando que as variações do gene são sorotipo grupo-específico (GRAM e ARHENS, 1998).

Na utilização do gene *cpx* (transporte de cápsula), Klein et al. (2003) obtiveram amplificação para todos os sorotipos, com exceção do sorotipo 4, pois mesmo com a grande conservação da região do DNA, há diferença na seqüência de nucleotídeos nos diferentes sorotipos (LO et al., 1998). No Brasil, onde há poucos dados sobre o isolamento do sorotipo 4 que causasse pleuropneumonia, sua aplicação é uma boa alternativa para definir o *status* da granja e para diagnóstico (KLEIN et al., 2003), além do teste não detectar nenhuma outra bactéria comumente encontrada no trato respiratório dos suínos, como o *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus indolicus*, *Actinobacillus porcicus*,

*Actinobacillus suis*, *Bordetella bronchyseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus porcinus*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus suis*, demonstrando alta especificidade na identificação do *A. pleuropneumoniae* (KLEIN, 2000).

Dos diversos métodos de PCR utilizados, os baseados na amplificação do gene *apxIVA* (responsável pela toxina IV) vêm sendo considerados de grande relevância, devido a alta especificidade pelo *A. pleuropneumoniae* (CHO e CHAE, 2001), não sendo encontrado em nenhuma outra espécie da família *Pasteurellaceae* (SCHALLER et al., 1999), permitindo sua precisa identificação, confirmação e detecção (SCHALLER, 2000). Segundo Cho e Chae (2001) o gene é encontrado em todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, sendo a toxina espécie-específica, constituindo num importante teste de diagnóstico e até mesmo na produção de vacinas.

Num estudo realizado por Fittipaldi et al. (2003) comparando oito testes de PCR baseados em diferentes genes espécie-específicos, constataram que PCR*apxIV* e *omIA* apresentaram alta especificidade pelo *A. pleuropneumoniae*, enquanto que o PCR *dsbE-like* obteve reação positiva para *A. porcitonisillarum* (GOTTSCHALK et al., 2003) e o gene *aroA* apresentou menor sensibilidade quando comparado com outros genes e obteve reação positiva para *A. suis*, podendo fornecer resultados equivocados.

A sensibilidade e a especificidade também podem ser influenciadas pelo tipo de PCR (MURDOCH, 2003). Uma das variações do PCR é a *Nested-PCR* (*N-PCR*) que consiste em uma segunda amplificação do produto da PCR utilizando *primers* internos específicos, os quais reconhecem a seqüência de nucleotídeos da primeira amplificação (BLANCHARD et al., 1996). Isto aumenta a sensibilidade da PCR pelo duplo processo de amplificação, além de confirmar a especificidade do produto da primeira reação (TANG et al., 1997). O *N-PCR* é geralmente mais sensível que o PCR, mas há maior risco de contaminação, pois os tubos (reações) precisam ser abertos após o 1º estágio para adição de mais reagentes para a 2º amplificação (MURDOCH, 2003). Schaller et al. (2001) desenvolveram um *N-PCR* para o gene *apxIV* e Cho e Chae (2003) otimizaram a técnica, aumentando a

sensibilidade na detecção do *A. pleuropneumoniae* pelo uso da técnica de N-PCR (10 organismos) quando comparada com a PCR ( $1 \times 10^4$  organismos).

A PCR multiplex, na qual amplifica mais de uma seqüência alvo na mesma reação (LO et al., 1998; MARKOULATOS et al., 2002), geralmente é menos sensível quando comparada com a PCR. A especificidade também pode ser reduzida se as temperaturas de anelamento dos pares de *primers* separados não forem iguais (MURDOCH, 2003). A PCR multiplex tem sido bastante utilizada para sorotipificação do agente, importante para monitoramento epidemiológico, prevenção, tratamento e erradicação da doença (LO et al., 1998; HÜSSY et al., 2004), pois evita as reações cruzadas observadas nos testes sorológicos utilizados na sorotipificação, pois envolve antígenos e anticorpos (MARKOULATOS et al., 2002) e apresenta alta especificidade na identificação do *A. pleuropneumoniae*, tornando um método importante para diagnóstico laboratorial (JESSING et al., 2003). Esta variação de PCR é baseada em gene espécie-específico para identificação do agente e gene sorotipo-específico para sorotipificação. A PCR multiplex sorotipo-específico foi desenvolvido por Lo et al. (1998) para identificação do sorotipo 5 utilizando gene *cpx* (espécie-específico) e *cps* (sorotipo-específico), gene responsável pela biossíntese do polissacarídeo capsular e altamente específico do sorotipo utilizado (HÜSSY et al., 2004). Jessing et al. (2003) desenvolveram uma PCR multiplex utilizando gene *omlA* para identificação do agente e gene *cps* para identificação dos sorotipos 2, 5 e 6. Sthitmatee et al. (2003) utilizaram multiplex baseado no gene *apxIV* e *apxI, II* e *III*. Os genes para as toxinas *ApxI, II* e *III* foram utilizados por Frey et al. (1995) no desenvolvimento de um eficiente método de PCR para tipificação das toxinas à partir de amostras de *A. pleuropneumoniae*. O inconveniente do uso destes genes é a não diferenciação do *A. pleuropneumoniae* de outras espécies bacterianas, pois os genes e toxinas *Apx* estão presentes em outras espécies da família *Pasteurellaceae*.

Outra variação da PCR é a *Real-time* PCR, na qual combina a amplificação da PCR e sistema de detecção fluorescente para análise dos resultados obtidos. Esta técnica é acurada, precisa e fácil de executar, e tem sido amplamente

utilizada na medicina veterinária, apresentando uma alta sensibilidade. Há três principais campos de interesse na utilização desta técnica: detecção de patógenos (vírus, bactérias, fungos etc), expressão gênica (citoquinas, fatores de crescimento) e discriminação alélica (mutações) e inclui ainda detecção de doenças genéticas e monitoramento do sucesso terapêutico (LEUTENEGGER, 2001). A *Real-time* PCR monitora a fluorescência emitida durante a reação de PCR como um indicador do produto amplificado durante cada ciclo (HIGUCHI, 1993). O aumento da fluorescência é proporcional à quantidade de produto da PCR na reação.

É essencial que o protocolo do PCR seja confiável para que possa ser usado em diferentes laboratórios, mas é bastante difícil comparar os resultados obtidos em diferentes investigações mesmo quando a mesma técnica de PCR é utilizada, pois as amostras clínicas, os protocolos com a preparação da amostra, controles e condições de PCR utilizadas são diferentes (MURDOCH, 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Otimização das condições de PCR para o gene *cpx* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Algumas condições do teste de PCR<sub>*cpx*</sub> foram previamente definidas e padronizadas por Kuchiishi (2003), como amostra clínica (biopsia tonsilar), tempo de pré-enriquecimento em meio líquido Lincomicina Bacitracina (LB) (Anexo II) (24 horas) e técnicas de extração de DNA (Fan et al., 1995). Em função das reações inespecíficas observadas quando utilizada o protocolo previamente padronizado, foi necessária uma otimização da PCR, na qual foram analisadas diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* e introduzida na técnica a *Platinum® Taq Antibody* para aumentar a especificidade do teste.

#### 4.1.1 Temperatura de anelamento dos *primers*

Foram analisadas diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* durante a etapa de amplificação do DNA utilizando amostras de referência de *A. pleuropneumoniae*. As temperaturas testadas foram 54°, 55°, 56° e 57 °C.

As 13 amostras de referência de *A. pleuropneumoniae* utilizadas pertencem a Embrapa Suínos e Aves (tabela 3) e estavam estocadas em leite desnatado sob congelamento a -70°C.

As amostras foram cultivadas em ágar sangue com uma estria perpendicular de *Staphylococcus aureus* e incubadas durante 18 horas em ambiente de microaerofilia (5% a 10% de CO<sub>2</sub>) a 37°C. Colônias com 1 a 2 mm de diâmetro, hemólise, satelitismo pela estria de *S. aureus* e reação de CAMP foram retiradas e repicadas em ágar Nicolet (Anexo I), na qual tiveram suas colônias raspadas da placa de cultivo e ressuspensas em 1 mL de água ultrapura para posterior extração do DNA.

Tabela 3. Amostras de referência dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

SOROTIPO	AMOSTRA	REFERÊNCIA
1	Shope 4047	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	WF 83 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 Culture Collection*;

Dr. Richard Ross, Iowa University, USA;

Dra. Ruth Petersen, Intervet, Dinamarca.

#### 4.1.2 Adição da *Platinum® Taq Antibody* nas reações de PCR<sub>cpx</sub>

No intuito de reduzir as reações inespecíficas observadas quando aplicada a técnica de PCR<sub>cpx</sub> em amostras biológicas foi introduzida na técnica a *Platinum® Taq Antibody* para aumentar a especificidade e principalmente reduzir a presença dessas amplificações. Nesta etapa de otimização da técnica foi utilizado tecido tonsilar contaminado artificialmente com *A. pleuropneumoniae*.

As amostras biológicas foram cultivadas em meio líquido LB e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação das amostras foi retirado 1 mL do cultivo para extração de DNA e realização da PCR<sub>cpx</sub>.

#### 4.1.3. PCR para gene *cpx* de *A. pleuropneumoniae*

A técnica de extração de DNA utilizada em todas as etapas foi descrita por Fan et al. (1995) e modificada por Kuchiishi (2003) (Anexo VII). Os *primers* para o gene *cpx* empregados na análise de PCR foram estabelecidos por Lo et al. (1998) (Anexo IV). O protocolo da técnica para um volume final de 25 µL por reação está descrito na tabela 4.

Tabela 4. Componentes da reação de PCR para amplificação do DNA de *A. pleuropneumoniae* com respectivos volumes e concentrações.

COMPONENTE	VOLUME NA REAÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Tampão <i>Taq</i> (Tris - HCl pH 8,3 e KCl)	2,5 µL	Tris - HCl (10 mM) KCl (50 mM)
MgCl <sub>2</sub>	1 µL	2,5 mM
dNTP's <sup>1</sup>	5 µL	200 µM (cada)
<i>Primer cpx</i> <sup>2</sup> UP	1 µL	30 pmol
<i>Primer cpx</i> DO	1 µL	30 pmol
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,2 µL	1 U
Água ultrapura	9,3 µL	-
Amostra de DNA	5 µL	-
Total	25 µL	-

<sup>1</sup>dNTP's: desoxinucleotídeo trifosfatado;

<sup>2</sup>*cpx*: gene responsável pelo transporte de cápsula.

Na etapa de otimização da técnica de PCR na qual foi adicionada *Platinum® Taq Antibody* o protocolo utilizado foi o mesmo descrito acima, sendo diminuído 0,2 µL do volume da água e acrescentado 0,2 µL de *Platinum® Taq Antibody* (1U por reação).

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler® Gradiente Eppendorf*) de acordo com as seguintes condições de temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com uma etapa a 94°C por cinco minutos e

amplificado por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* de acordo com as temperaturas testadas (54°, 55°, 56° e 57°C) durante 45 segundos, polimerização a 72°C por dois minutos. Depois de completados os 30 ciclos, uma etapa final consistia de anelamento por cinco minutos e polimerização a 72°C por 10 minutos. A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo, amostra de referência de *A. pleuropneumoniae*, e um controle negativo, reação de PCR sem amostra de DNA.

#### 4.1.4. Detecção do produto amplificado

Aproximadamente 25% (10 µL) do volume das amostras, juntamente com marcador de peso molecular (100pb *Ladder Amersham Pharmacia*), foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) (TAYLOR, 1993), por aproximadamente 60 minutos, e os produtos resultantes da amplificação visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta. O tampão TEB (Tris, EDTA e ácido bórico) 1X (Anexo IV) foi utilizado para a corrida eletroforética (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.1.5 Padronização das Unidades Formadoras de Colônia da amostra

Para observar a concentração mínima de bactérias presentes na diluição, a amostra de referência de *A. pleuropneumoniae* (ATCC 33377) pertencente à Embrapa Suínos e Aves foi cultivada em meio ágar Nicolet e o crescimento bacteriano raspado e diluído em solução salina. A diluição foi padronizada na concentração  $1,5 \times 10^9$  bactérias/mL, correspondente ao tubo cinco da escala *MacFarland*, e realizadas diluições seriadas na base 10 até a diluição  $10^{-12}$ . De cada diluição, foram semeados 100 µL em cada placa de ágar Nicolet (em triplicata) e incubadas a 37°C durante 18 horas em condição microaerófila para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e retirada 1 mL das diluições para realização da PCR.



#### 4.1.6 Teste de especificidade

A PCR<sub>cpx</sub> foi aplicada em amostras de bactérias presentes no trato respiratório dos suínos (Tabela 5) para avaliar a especificidade do teste.

Tabela 5. Amostras bacterianas utilizadas nos teste de especificidade da PCR<sub>cpx</sub>

ESPÉCIE	AMOSTRA	REFERÊNCIA
<i>Actinobacillus indolicus</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Actinobacillus minor</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Actinobacillus porcinus</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Actinobacillus suis</i>	110UK	Dr. D. Barcellos
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Haemophilus parasuis</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Haemophilus porcinus</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Pasteurella multocida</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	ATCC 25923
<i>Streptococcus suis</i>	Isolado de campo	CNPSA-EMBRAPA

ATCC: American Type Culture Collection;  
Dr. David Barcellos, UFRGS, Brasil.

As amostras utilizadas pertencem a Embrapa Suínos e Aves e estavam estocadas em leite desnatado sob congelamento de -70°C. As bactérias NAD-independentes foram cultivadas em ágar sangue e incubadas durante 18 horas a 37°C e, após o crescimento, foram repicadas em ágar nutritivo. As amostras bacterianas NAD-dependentes, *Actinobacillus indolicus*, *Actinobacillus porcinus* e *Haemophilus parasuis*, foram cultivadas em ágar sangue com uma estria perpendicular de *Staphylococcus aureus*, incubadas durante 18 horas em ambiente de microaerofilia (5% a 10% de CO<sub>2</sub>) a 37°C e repicadas em ágar Nicolet para realização da PCR.

## 4.2 Inoculação experimental com *A. pleuropneumoniae*

A inoculação experimental foi realizada para aplicar a técnica de PCR<sub>cpx</sub> em animais sabidamente positivos e observar por quanto tempo era possível detectar o *A. pleuropneumoniae* pela técnica de PCR em animais infectados. Esta etapa também foi utilizada para definir melhor método de colheita de material e meio de transporte.

### 4.2.1 Preparação do inóculo

Para a preparação das diferentes diluições bacterianas, a amostra de referência de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5b (L20, Dr. R. Ross) foi cultivada em meio ágar Nicolet, o crescimento bacteriano raspado e diluído em solução salina estéril, padronizado na concentração  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL, correspondente ao número 5 da escala *MacFarland*, e realizadas diluições bacterianas seriadas até diluição  $10^{-8}$ .

### 4.2.2 Procedimento e técnica de inoculação

Foram utilizados quatro leitões provenientes do sistema SPF (*Specific Pathogen Free*) com 94 dias de idade. Antes da inoculação, foi colhido sangue para teste de ELISA e suabe e biópsia tonsilar para teste de isolamento bacteriológico e PCR. Todos os testes resultaram negativos para *A. pleuropneumoniae*.

Três leitões foram experimentalmente inoculados via intranasal com *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5b, nas doses de  $10^8$  UFC/mL,  $10^4$  UFC/mL e  $10^2$  UFC/mL (0,5 mL em cada narina), e um leitão mantido em contato (controle negativo). Diferentes diluições bacterianas de inoculação foram utilizadas para observação da intensidade dos sinais clínicos e influência na detecção do agente pelo método da PCR<sub>cpx</sub>.

#### 4.2.3 Colheita e processamento do material

Foram realizadas cinco colheitas pós-inoculação com intervalo de 15 dias entre as colheitas, em um período de 67 dias, sendo que a primeira colheita foi realizada após 15 dias da inoculação. De cada animal foi colhido 10 mL de sangue mediante punção da veia cava cranial utilizando seringa descartável com agulha 80 x 10 e o soro mantido à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Foram colhidos com o auxílio do abridor de boca, dois suabes tonsilares e dois fragmentos de tecido tonsilar com pinça de biopsia por animal, num total de oito suabes e oito fragmentos de tecido tonsilar por colheita. O material foi conservado em dois diferentes meios de transporte: quatro suabes e quatro fragmentos conservados em solução salina estéril e quatro suabes e quatro fragmentos conservados em meio líquido LB. Todas as amostras foram acondicionadas em microtubos contendo 300  $\mu\text{L}$  do meio até a chegada ao laboratório, onde foram adicionadas a 5 mL de meio líquido LB e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (pré-cultivo). Após o período de incubação foi realizada PCR para o gene *cpx*.

As amostras de soro foram submetidas ao teste de ELISA polivalente baseado nos antígenos capsulares LPS-CL dos sorotipos 3, 5 e 7 desenvolvido por Machado (1997). Este teste apresenta reações cruzadas, possibilitando a detecção dos sorotipos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, mas não diferencia o sorotipo infectante.

#### **4.3 Avaliação da influência do tecido tonsilar na sensibilidade do teste de PCR<sub>cpx</sub>**

O efeito do tecido tonsilar sobre os resultados da PCR foi avaliado por um experimento de contaminação artificial de tonsilas com *A. pleuropneumoniae*. As tonsilas foram obtidas de dois suínos soronegativos no ELISA e suas tonsilas negativas no isolamento bacteriológico e na PCR para *A. pleuropneumoniae*. Os animais pertenciam à Embrapa Suínos e Aves.

O tecido tonsilar foi contaminado experimentalmente com *A. pleuropneumoniae*, conforme o delineamento experimental, e realizado PCR para o gene *cpx*.

#### 4.3.1 Delineamento experimental

As variáveis testadas foram: diferentes quantidades de tecido tonsilar e concentração bacteriana. A quantidade de tecido tonsilar foi estabelecida em porções colhidas com pinça de biopsia. Foram comparadas uma, duas e três porções e comparadas as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  a partir da concentração  $1,5 \times 10^9$  bactérias/mL (tubo 5 da escala de *MacFarland*) da amostra.

Além dos tratamentos que serviram como controles (T1, T2 e T3), o experimento teve o delineamento fatorial 3x3 (T4 ao T12). Os tratamentos estão descritos a seguir: T1= salina estéril como controle negativo; T2= diluição  $10^{-3}$  como controle positivo; T3= diluição  $10^{-6}$  como controle positivo, T4= uma porção de tonsila + salina estéril, T5= duas porções de tonsila + salina estéril; T6= três porções de tonsila + salina estéril; T7= uma porção de tonsila + diluição  $10^{-3}$ , T8= duas porções de tonsila + diluição  $10^{-3}$ ; T9= três porções de tonsila + diluição  $10^{-3}$ ; T10= uma porção de tonsila + diluição  $10^{-6}$ , T11= duas porções de tonsila + diluição  $10^{-6}$ ; T12= três porções de tonsila + diluição  $10^{-6}$ .

#### 4.3.2 Processamento laboratorial

Para o preparo das diluições bacterianas, a amostra de referência de *A. Pleuropneumoniae* 5b (L20, Dr. R. Ross) foi cultivada em meio ágar Nicolet e o crescimento bacteriano padronizado na concentração  $1,5 \times 10^9$ /mL e diluído na base 10. Foram utilizadas as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  com contagem paralela de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e medida de Densidade Óptica (DO) (540 nm).

As porções de tonsila foram maceradas e armazenadas em microtubos e acrescidas de 100 $\mu$ L/porção de solução salina ou diluição bacteriana de acordo com o tratamento.

O tecido tonsilar tratado e os controles permaneceram por 30 minutos a 37°C para possibilitar o contato da bactéria com o tecido, posteriormente adicionados a 5 mL de meio líquido LB e incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a reação de PCR para o gene *cpx*.

#### **4.4 Validação do teste de PCR*cpx* em amostras clínicas provenientes de rebanhos**

Com o objetivo de analisar e validar o teste, a metodologia de PCR padronizada para o gene *cpx* foi utilizada em três rebanhos em diferentes *status* sanitário quanto à apresentação clínica da pleuropneumonia suína, a saber:

- Rebanho com infecção recente: localizado no município de Orleans, estado de Santa Catarina. Sistema de produção em ciclo completo, sem vazio sanitário, composto por 350 matrizes. Na visita foram observados desuniformidade de lotes e sinais clínicos característicos de pleuropneumonia com registros de pleurisia e condenação de pulmão por nódulos e abscessos no abate. Foi registrado surto de pleuropneumonia com diagnóstico laboratorial e isolamento do *A. pleuropneumoniae* em maio de 2004, após o qual foi estabelecido programa de vacinação.
- Rebanho com infecção antiga: localizado no município de Concórdia, estado de Santa Catarina. Sistema de produção em ciclo completo, sem vazio sanitário, composto por 17 matrizes. Na visita não foram observados sinais de pleuropneumonia, mas apresentava registro de pleurisia e condenação de pulmão por nódulos e abscessos em 11 animais do total de 334 abatidos. A granja apresentou histórico de surto de pleuropneumonia no ano de 1993, com diagnóstico laboratorial e isolamento do *A. pleuropneumoniae*.
- Rebanho sem apresentação clínica da doença: localizado no município de Entre Rios, estado do Paraná. Sistema de produção em ciclo completo,

com vazio sanitário, composto por 215 matrizes. Na visita não foram observados sinais clínicos e não apresentava registro de pleuropneumonia e sem histórico de pleurisia e condenação de pulmão por nódulos e abscessos no abate. Não possui programa de vacinação para pleuropneumonia.

Os animais de cada rebanho amostrado foram divididos em cinco lotes de 20 animais, totalizando 100 animais, com exceção do rebanho com presença de infecção antiga, onde foram colhidas amostras de apenas 82 animais em decorrência da falta de animais com as idades testadas. Os lotes foram divididos conforme as idades: 11, 13, 15, 17 e 19 semanas.

Foi colhida, de cada animal, porção de tecido tonsilar com pinça de biopsia, adicionadas diretamente em meio líquido LB e mantidas a 37°C até a chegada ao laboratório. Foi realizado isolamento bacteriológico tradicional em meio ágar sangue e meio seletivo CVLB (Anexo III) e, em seguida, as amostras foram submetidas à extração de DNA e realização da PCR<sub>cpx</sub>. Além do tecido tonsilar, foi colhido 10 mL de sangue de cada animal para determinação do perfil sorológico dos rebanhos pelos testes de ELISA polivalentes baseados em LPS.

#### **4.5 Sequenciamento do produto amplificado pela PCR<sub>cpx</sub>**

O produto amplificado de uma amostra de campo (amostra do rebanho com infecção antiga) foi separado, purificado pelo *kit Concert™ Nucleic Acid Purification System (Invitrogen)* e guardado à -20°C para sequenciamento. A amostra purificada foi quantificada em gel de agarose a 1% de concentração com marcador de peso molecular Lambda (Promega). Para sequenciamento foi utilizado o *kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, onde foi utilizada uma quantidade correspondente a 30 ng de DNA junto com 8 µL de Big Dye 3.0, 0,5 µL de *primer* e água ultrapura suficiente para completar 20 µL. A reação foi colocada no termociclador com programa para 25 ciclos a 96°C por 30

segundos; 50°C por 15 segundos e 60°C por quatro minutos. A seguir, o DNA foi precipitado de acordo com o *Gene Scan® Reference Guide*. Foram colocados 2 µL da reação no gel de eletroforese e submetida à corrida, durante 9 horas, no seqüenciador *ABI PRISM® 377 DNA Sequencers* que analisa fragmentos de DNA marcados com fluoróforos que separam fragmentos de DNA por tamanho.

Após sequenciamento, a leitura foi analisada no *GenBank®* com o objetivo de confirmar se os fragmentos de PCR *cpx* amplificados fazem parte da seqüência do gene *cpxCB* de *A. pleuropneumoniae*.

#### **4.6 Análise estatística**

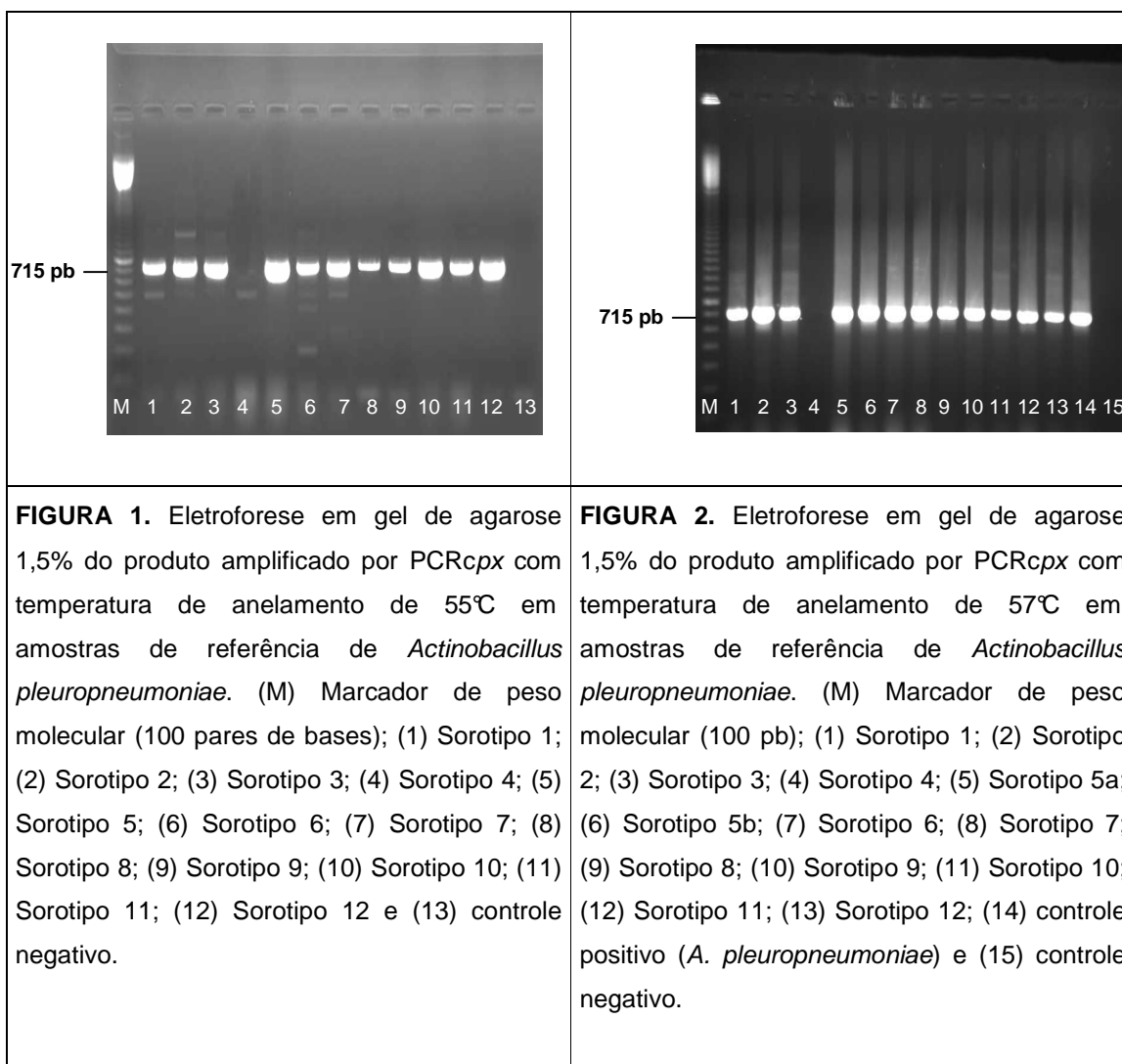
Para comparação estatística dos tratamentos do experimento de avaliação da influência do tecido tonsilar na sensibilidade do teste de PCR (Item 6) foi utilizado o teste exato de Fisher. Nas demais etapas as análises foram descritivas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Otimização das condições de PCR para o gene *cpx* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

#### 5.1.1 Temperatura de anelamento dos *primers*

Entre os procedimentos adotados na otimização da PCR<sub>*cpx*</sub>, a temperatura de 57°C para anelamento dos *primers* minimizou a amplificação de bandas inespecíficas (Figura 1 e 2).





### 5.1.2 Adição de *Platinum® Taq Antibody* nas reações de PCR

A adição da *Platinum® Taq Antibody* reduziu as amplificações inespecíficas observadas quando o teste era aplicado em amostras biológicas (Figura 3). Esta condição estabelecida não afeta a amplificação nem a intensidade do produto de 715 pb característico do *A. pleuropneumoniae*.

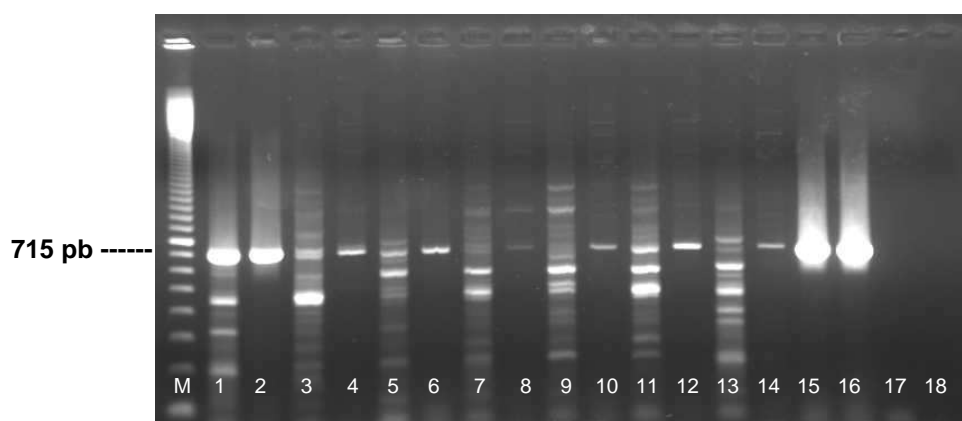


FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> em amostras biológicas (tecido tonsilar) contaminadas com *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (M) Marcador de peso molecular (100 pares de bases); (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) amostras biológicas sem adição de *Platinum®Taq Antibody* na reação de PCR; (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14) amostras biológicas com adição de *Platinum®Taq Antibody* na reação de PCR; (15 e 16) controles positivos (*A. pleuropneumoniae*); (17 e 18) controles negativos.

### 5.1.3 Limiar de detecção

A análise do limiar de detecção do agente pelo teste de PCR<sub>cpx</sub> foi realizada pela visualização dos resultados obtidos na amplificação dos produtos em gel de agarose após corrida eletroforética utilizando diluições bacterianas seriadas. Foi detectada amplificação até a diluição que continha 730 UFC/mL (Figura 4).



FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> na detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae* em diluições bacterianas seriadas para análise do limiar de detecção. (M) Marcador de peso molecular (100 pares de bases); (1) diluição  $10^{-1}$ ; (2) diluição  $10^{-2}$ ; (3) diluição  $10^{-3}$ ; (4) diluição  $10^{-4}$ ; (5) diluição  $10^{-5}$ ; (6) diluição  $10^{-6}$ ; (7) diluição  $10^{-7}$ ; (8) diluição  $10^{-8}$ ; (9) diluição  $10^{-9}$ ; (10) diluição  $10^{-10}$ ; (11) diluição  $10^{-11}$ ; (12) diluição  $10^{-12}$ ; (13) controle positivo (*A. pleuropneumoniae*) e (14) controle negativo.

#### 5.1.4 Teste de especificidade

A especificidade da PCR<sub>cpx</sub> foi comprovada pela aplicação do teste em amostras culturas puras de outras espécies bacterianas, onde não foi observada nenhum produto resultante da amplificação do DNA, com exceção da amostra de referência de *A. pleuropneumoniae* utilizada como controle positivo do teste (Figura 5).



FIGURA 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto amplificado por PCR<sub>cpx</sub> na detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (M) Marcador de peso molecular (100 pares de bases); (1) *Actinobacillus indolicus*; (2) *Actinobacillus minor* (6985); (3) *Actinobacillus minor* (7000); (4) *Actinobacillus porcinus*; (5) *Actinobacillus suis*; (6) *Bordetella bronchyseptica*; (7) *Haemophilus parasuis*; (8) *Haemophilus porcinus*; (9) *Pasteurella multocida*; (10) *Staphylococcus aureus*; (11) *Streptococcus suis*; (12) controle positivo (*A. pleuropneumoniae*) e (13) controle negativo.

## 5.2 Inoculação experimental com *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Na inoculação experimental foi observado o tempo de detecção do *A. pleuropneumoniae* pós-infecção (PI) pela técnica de PCR<sub>cpx</sub> em animais sabidamente infectados. Os resultados obtidos nas colheitas estão resumidos na tabela 8. Os resultados por animal constam no anexo V.

Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos quando utilizados diferentes meios de transporte (LB e salina) e diferentes materiais utilizados (suabe e biopsia), pois o número de animais não foi suficiente para defini-los. Nas etapas seguintes do trabalho foi utilizada biopsia de tecido tonsilar, descrita por Kuchiishi (2003).

Tabela 6. Número de amostras positivas na PCR<sub>cpx</sub> provenientes de três leitões inoculados com *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5b e um leitão mantido em contato conforme material colhido e meio de transporte.

Tempo (dias PI <sup>2</sup> )	Suabe		Biopsia	
	Salina	LB <sup>1</sup>	Salina	LB
15	3/4	4/4	4/4	2/4
30	2/4	1/4	1/4	1/4
45	0/4	1/4	0/4	0/4
60	0/4	0/4	0/4	0/4
75	0/4	0/4	0/4	0/4

<sup>1</sup>LB: meio líquido lincomicina bacitracina;

<sup>2</sup>PI: pós-inoculação.

### 5.3 Avaliação da influência do tecido tonsilar na sensibilidade da PCR<sub>cpx</sub>

Os resultados (Tabela 9) demonstram que nos tratamentos T1, T4, T5 e T6, que não receberam a suspensão bacteriana, o resultado foi sempre negativo. Nos tratamentos T2 e T3 onde havia apenas a suspensão bacteriana, sem adição de tecido tonsilar, os resultados foram sempre positivos. Na diluição  $10^{-3}$ , com adição de tecido tonsilar (T7, T8 e T9), todas as reações foram positivas, diferente do observado nos tratamentos T10, T11 e T12, onde houve efeito negativo do tecido nas reações de PCR.

Tabela 7. Resultados obtidos pelo método da PCR<sub>cpx</sub> na detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae* em diferentes diluições bacterianas e número de porções de tecido tonsilar.

Tratamento	Material	Diluição	Porção de tecido	Resultados (por repetição)									
				1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
T1	Salina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	Bactéria	10 <sup>-3</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3		10 <sup>-6</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4	Salina		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T5			2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T6			3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T7	Tecido tonsilar	10 <sup>-3</sup>	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T8			2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T9			3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T10	10 <sup>-6</sup>		1	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
T11			2	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
T12			3	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+

#### 5.4 Validação do teste de PCR<sub>cpx</sub> em amostras clínicas provenientes de rebanhos

##### 5.4.1 Isolamento bacteriológico tradicional do *A. pleuropneumoniae*

Não foi isolado o *A. pleuropneumoniae* em nenhum dos rebanhos testados. Houve isolamento apenas de bactéria NAD-dependente classificada bioquimicamente como *Actinobacillus minor* do rebanho com *status* de infecção antiga.

#### 5.4.2. Teste de PCR<sub>cpx</sub> para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Os resultados de PCR estão representados na tabela 8.

Tabela 8. Amostras positivas pela PCR<sub>cpx</sub> na detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos de diferentes idades provenientes de três rebanhos com diferentes *status* sanitários quanto à apresentação clínica da pleuropneumonia suína.

Status sanitário do rebanho	Idade (semanas)				
	11	13	15	17	19
Infecção recente	3/20	2/20	0/20	2/20	0/20
Infecção antiga	6/13	0/20	2/20	7/10	10/19
Sem apresentação clínica	2/20	0/20	1/20	1/20	2/20

#### 5.4.3 Perfil sorológico

O perfil sorológico e os resultados da PCR<sub>cpx</sub> obtidos dos animais em diferentes *status* sanitários estão representados nas Figuras 6, 7 e 8.

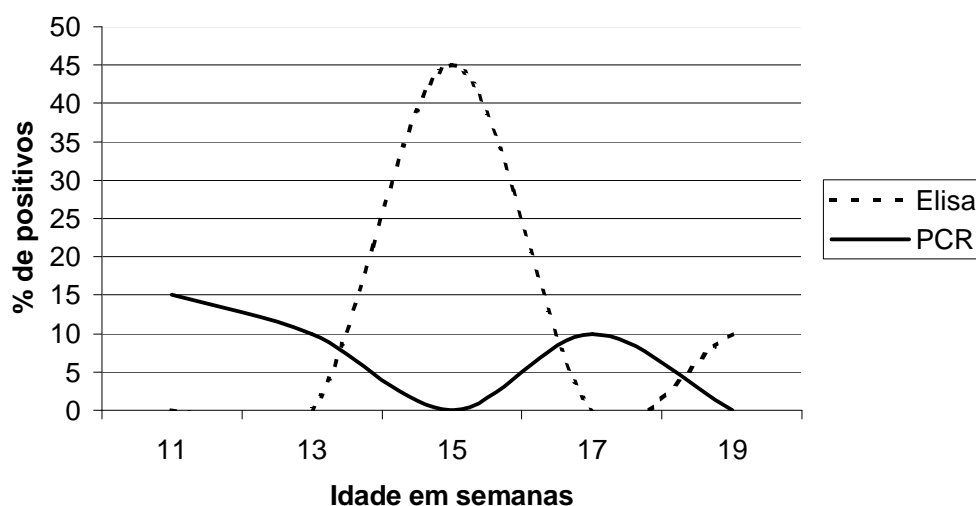


FIGURA 6. Percentual de amostras positivas obtidas no teste de ELISA e PCR<sub>cpx</sub> na detecção da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* aplicados em 100 suínos de diferentes idades pertencentes ao rebanho com infecção recente.

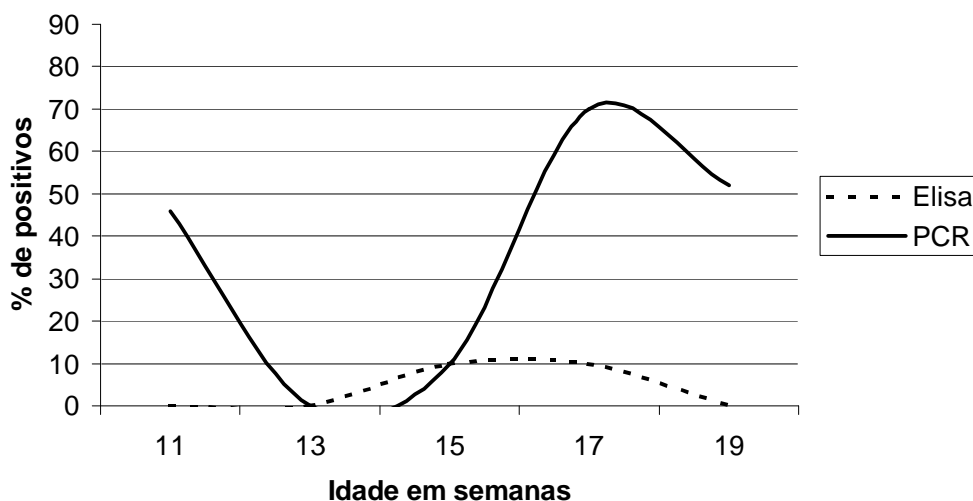


FIGURA 7. Percentual de amostras positivas obtidas no teste de ELISA e PCRcpX na detecção da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* aplicados em 82 suínos de diferentes idades pertencentes ao rebanho com infecção antiga.

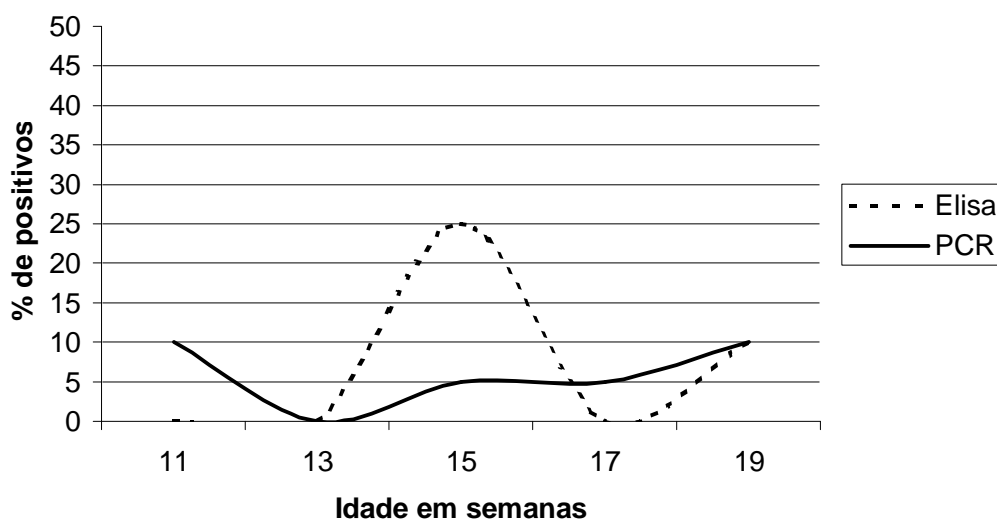


FIGURA 8. Percentual de amostras positivas obtidas no teste de ELISA e PCRcpX na detecção da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* aplicados em 100 suínos de diferentes idades pertencentes ao rebanho sem apresentação clínica da doença.

## 5.5 Sequenciamento do produto amplificado pela PCR<sub>cpx</sub>

O produto amplificado pela PCR<sub>cpx</sub> proveniente de campo foi seqüenciado e comparado com a seqüência do gene *cpxCB* disponível no *GenBank*® para confirmar se a amostra obtida pertence mesmo ao *A. pleuropneumoniae*. O resultado demonstrou 93,39% de similaridade, ou seja, 93,39% dos nucleotídeos obtidos no sequenciamento da amostra de campo são idênticos ao da seqüência do gene *cpxCB* depositado no *GenBank*® (Figura 9).

<b>cpx 715</b>	1	TCCTCAA	AAT	CAGACCG	CCTT	TAACCGGT	GT	CGGTGCCT	TA	40
<b>Amostra de campo</b>	1	TCCTCAGA	AAT	CANGCNG	GCTN	TGTCCGGT	GT	CGGTGCCT	GA	40
<b>cpx 715</b>	41	TTACAAG	GTT	CCGGATTT	TTC	TCGAGCT	CAA	GATGATA	CTT	80
<b>Amostra de campo</b>	41	ATACAAG	GTT	CCGGATTT	TTC	TCGAGCT	CAA	GANGATN	CTN	80
<b>cpx 715</b>	81	ATACCGT	AACA	AGAATATA	TATG	CATTCTC	GT	CGGCACT	AGA	120
<b>Amostra de campo</b>	81	ATACCGT	NCA	AGAATATA	TATG	CATTCTC	GT	CGGCACT	AGA	120
<b>cpx 715</b>	121	ACAGTTA	ATG	AAAGACT	TGC	CAATACG	TGA	ATACTAT	GAG	160
<b>Amostra de campo</b>	121	ACAGTTA	ATG	AAAGACT	TGC	CAATACG	TGA	ATACTAT	GAG	160
<b>cpx 715</b>	161	AATCAAG	GCG	ATATTAT	CGC	TCGCTTT	AAT	GGATTTG	GTT	200
<b>Amostra de campo</b>	161	AATCAAG	GCG	ATATTAT	CGC	TCGCTTT	AAT	GGATTTG	GTT	200
<b>cpx 715</b>	201	TAAATAA	TAG	TAAAGA	AAGCG	TTTTATA	AAAT	ATTC		235
<b>Amostra de campo</b>	201	TAAATAA	TAG	TAAAGA	AAGCG	TNTTAN	NGAN	ATT-C		234

Figura 9 - Alinhamento de parte da seqüência de nucleotídeos dos genes *cpxCB* do *operon cpx* (*Genbank* sob registro n° U36397) que codifica proteínas de transporte de cápsula de *Actinobacillus pleuropneumoniae* com a seqüência de nucleotídeos da amostra amplificada proveniente de rebanho suíno com histórico de infecção antiga (Santa Catarina, Brasil, 2004).



## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi otimizado o teste de PCR para o gene *cpx* de *A. pleuropneumoniae* com o objetivo de detectar o agente em amostras provenientes de suínos. Na literatura foram descritos diferentes métodos de extração de DNA, tipos de amostras biológicas e meios de conservação (MØLLER et al., 1993; SAVOYE et al., 2000; KUCHIISHI, 2003). Kuchiishi (2003) definiu algumas etapas importantes como biopsia tonsilar com 24 horas de pré-enriquecimento em meio líquido LB e técnica de Fan et al. (1995) para extração de DNA. Foi necessária uma otimização da PCR<sub>*cpx*</sub> já previamente padronizada para reduzir a presença de ampliações inespecíficas. Essas ampliações provavelmente são originadas de outros contaminantes presentes na microflora das tonsilas, sendo que a quantidade de produtos inespecíficos varia de acordo com o meio utilizado no pré-cultivo das amostras e variam entre rebanhos (GRAM et al., 1996). Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*, sendo padronizada para a temperatura de 57°C, com a qual foram obtidos os melhores resultados na amplificação. Também foi adicionada *Platinum® Taq Antibody* para reduzir produtos inespecíficos. A mesma bloqueia a ação da *Taq* DNA polimerase em temperatura ambiente durante a preparação da reação, liberando sua ação após atingir a temperatura de desnaturação da fita de DNA (94°C). Este método é tipicamente utilizado para aumentar especificidade do teste. A utilização da *Platinum® Taq Antibody* exige ótimas condições de temperatura, tempo de incubação de cada etapa da amplificação, concentração da *Taq* polimerase, *primers*, MgCl<sub>2</sub> e da amostra de DNA.

A otimização da técnica PCR<sub>*cpx*</sub> permitiu a amplificação de um produto de 715 pb em todas as amostras padrão de *A. pleuropneumoniae*, com exceção do sorotipo 4, como observado anteriormente por Lo et al. (1998), Klein (2000) e Fittipaldi et al. (2003). Tendo em vista que existem poucos registros do sorotipo 4 causando pleuropneumonia no Brasil, a técnica de PCR<sub>*cpx*</sub> pode-se constituir em uma excelente método para diagnóstico e para definição de *status* de granja (KLEIN et al., 2003). Klein (2003) com o objetivo de caracterizar a região dos genes que codifica as proteínas responsáveis pelo transporte de cápsula do

sorotipo 4 realizou hibridização do DNA total com a sonda heteróloga PPcpx do sorotipo 5a. Os resultados observados demonstraram que, mesmo com a grande conservação desta região do DNA, há diferença na seqüência de nucleotídeos nos diferentes sorotipos (LO et al., 1998), resultando na ausência de amplificação de um fragmento de 715 pb para o sorotipo 4, característico do *A. pleuropneumoniae*. Schuchert et al. (2004) desenvolveram um *primer* na região *cpx* do gene que amplifica um produto de 489 pb do gene *cpxA* para todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, inclusive sorotipo 4.

Na avaliação do limiar de detecção, o PCR<sub>cpx</sub> conseguiu detectar uma concentração mínima de  $7,3 \times 10^2$  UFC/mL organismos, quantidade relativamente alta quando comparada com outros trabalhos baseados no gene *cpx*, como observado por Lo et al. (1998), onde detectaram uma concentração mínima de 100 UFC/mL. Entre os registros da literatura utilizando teste de PCR convencional para detecção de *A. pleuropneumoniae*, o menor número de UFC/mL (50) foi detectado por Gram e Ahrens (1998) utilizando *primer* para o gene *omIA*. Anteriormente, Gram et al. (1996) tinha detectado 500 UFC/mL utilizando *primer* universal., Lo et al. (1998), com a PCR multiplex, detectaram 100 UFC/mL de *A. pleuropneumoniae*. O *Nested*-PCR, outra variação da PCR, que tradicionalmente aumenta a sensibilidade do teste, não está disponível para detecção do *A. pleuropneumoniae*. Outros agentes respiratórios podem ser detectados por essa técnica (CALSAMIGLIA et al., 1999; VERDIN et al., 2000; JUNG et al., 2004). Jung et al. (2004), na detecção de *Haemophilus parasuis*, conseguiram detectar uma concentração mínima de  $1 \times 10^2$  UFC/mL, enquanto que o *Nested* PCR detectou concentração mínima de 3 UFC/mL. Já foi descrita a amplificação de DNA de apenas uma célula bacteriana presente (LI et al., 1988), mas este nível de detecção é raramente obtido nos testes diagnósticos. O alto limiar de detecção encontrado pode ser resultante da incompleta extração de DNA da bactéria, inibição da DNA polimerase ou atividade de DNA'ses na etapa de lise da bactéria.

O resultado do teste de especificidade mostrou que somente nas amostras de referência do *A. pleuropneumoniae* foi visualizado um produto de 715 pb e nenhum outro fragmento de amplificação foi observado nas amostras de outras

espécies bacterianas utilizadas no teste, como foi constatado também por Lo et al. (1998), Fittipaldi et al. (2003) e Schuchert et al. (2004). A especificidade é essencial para validação do resultado positivo. A partir destes resultados podemos concluir que a técnica de PCR<sub>cpx</sub> apresenta alta especificidade podendo ser aplicada na caracterização da espécie em casos clínicos de pleuropneumonia considerando que, quando negativo o resultado, outro teste diagnóstico deve ser utilizado para a identificação do sorotipo 4.

Analisando os resultados obtidos no experimento de inoculação experimental foi confirmada a influência negativa da amostra tonsilar no teste de PCR<sub>cpx</sub> e que, mesmo com o estabelecimento da infecção, comprovada pelos resultados positivos de todos os animais no teste sorológico de ELISA, o animal é capaz de eliminar o *A. pleuropneumoniae* após um período de infecção. Este experimento demonstrou a importância de colher material de animais com diferentes idades, para que haja acompanhamento da infecção, desde o estabelecimento da mesma até uma possível eliminação do agente.

Em um estudo realizado por Fano et al. (2004) na detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* pelo teste de PCR e *Nested-PCR* aplicados em suabe nasal, foi observado que a detecção do agente em infecção crônica foi proporcionalmente menor quando comparada com infecção aguda, mesmo utilizando *Nested-PCR*. O aparecimento de resultados falso-negativos nos casos crônicos de infecção também foi observado por Zeeh et al. (2004) utilizando *Real time PCR* na detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae*. Isto sugere que a presença do agente no trato respiratório superior pode ser um evento transitório, além de estar presente em pequena quantidade em portadores sadios, sendo necessárias considerações sobre a fase da doença na interpretação dos resultados.

Os resultados obtidos no experimento de contaminação artificial de tonsilas demonstraram que o tecido tonsilar ou substâncias presentes na amostra colhida, como enzimas e sangue, interferem negativamente nos resultados da amplificação, por apresentar substâncias inibidoras da reação de PCR. Este experimento demonstrou que, mesmo com quase três vezes a quantidade mínima

de UFC/mL necessária para detecção pela PCR<sub>cpx</sub> (1990 UFC/mL), a amostra tonsilar teve influência negativa nas reações de PCR.

A biopsia de tecido tonsilar é o material de eleição na detecção do *A. pleuropneumoniae*. No primeiro contato do agente com o hospedeiro, o mesmo adere-se ao epitélio tonsilar do animal, podendo sobreviver nas criptas tonsilares em estágio crônico da infecção, tornando os animais portadores do agente sem presença clínica da doença (HAMER-BARRERA et al., 2004). Os pontos críticos da utilização da tonsila são o número pequeno de bactérias presentes no tecido tonsilar em relação ao poder de detecção da PCR nos casos de infecção assintomática, os efeitos inibidores do tecido, por enzima e sangue, e interferência da flora concomitante. Para aumentar a população da bactéria alvo foi utilizado um sistema de pré-cultivo com meio de cultura seletivo, meio enriquecido LB, que inibe a flora concorrente e aumenta o número de resultados positivos na PCR quando comparado com meios não-seletivos (GRAM et al., 1996).

Com relação à quantidade de material tonsilar por amostra Fittipaldi et al. (2003) demonstraram que porções de 0,5g proporcionam uma maior possibilidade de detecção do agente na PCR do que a porção obtida pela biopsia, que é de 0,1 a 0,2 g. A menor quantidade de tecido tonsilar obtido pela biopsia (SAVOYE et al., 2000) possui proporcionalmente menor quantidade de bactérias. Este fato foi constatado no experimento realizado com contaminação artificial de tonsilas, onde o maior número de porções de tecido tonsilar utilizado proporcionou o aumento de resultados positivos na amplificação (tratamentos 10, 11 e 12), onde o número de reações positivas foi 2, 3 e 5, respectivamente. Este fato pode ser explicado pelo aumento no número inicial de bactérias uma vez que os tratamentos 11 e 12 receberam, duas e três vezes mais bactérias do que o tratamento 10, proporcionalmente ao número de porções de tonsila. Mesmo com o efeito negativo do tecido tonsilar, esta amostra continua sendo de eleição, uma vez que os resultados são melhores quando comparados com suabe (MOLLER et al., 1993).

Na validação do teste em animais com diferentes estágios de infecção por *A. pleuropneumoniae* não houve isolamento do agente pelo método bacteriológico tradicional em nenhuma granja testada, mesmo utilizando meios seletivos,

demonstrando a dificuldade de recuperação do agente. Foi isolado apenas o *Actinobacillus suis* no rebanho com infecção antiga. O isolamento da bactéria a partir de tonsilas apresenta baixa sensibilidade, pois as tonsilas são fortemente colonizadas por outras espécies bacterianas NAD-dependentes que podem interferir negativamente no isolamento e detecção do agente, como também o pouco número de células de *A. pleuropneumoniae* presentes em animais portadores assintomáticos da doença.

No processo de validação do teste de PCR<sub>cpx</sub> em amostras de campo foi realizado um estudo comparativo entre os resultados obtidos no ELISA e na detecção pela PCR<sub>cpx</sub>. O *A. pleuropneumoniae* foi detectado pela PCR em todos os rebanhos testados, com maior positividade em animais com 11 semanas de idade, coincidindo com o período de disseminação do agente. Estes resultados concordam com o observado por Kuchiishi (2003), onde conseguiu detectar o *A. pleuropneumoniae* em animais com 11 semanas de idade em três das quatro granjas testadas, concordando também com os achados de Kume et al. (1984), na qual isolaram um número grande de *A. pleuropneumoniae* na 12ª semana de idade. Também foi observado que não houve detecção do agente pela PCR em pelo menos uma das idades testadas em todos os rebanhos, podendo ser resultante da aleatoriedade das amostras ou pela eliminação do agente pelo animal após certo período de infecção.

No rebanho com infecção antiga os resultados mostram que a PCR detectou um número maior de animais positivos na 17ª semana de idade, indicando o período de maior difusão do agente como resultado da alta pressão de infecção no rebanho, provavelmente pela ausência de um programa de vacinação para pleuropneumonia. Neste caso poderia também estar ocorrendo uma maciça proteção passiva e com isso os leitões só se infectariam tardiamente quando os anticorpos passivos já se encontravam em declínio.

No rebanho com infecção recente observaram-se poucos resultados positivos no teste de PCR quando comparados aos obtidos no rebanho com infecção antiga, explicado pela adoção de um programa de vacinação, na qual reduziu bastante a pressão de infecção e, conseqüentemente, o número de

animais infectados. No rebanho sem apresentação clínica da doença também foi observado nível baixo de resultados positivos, provavelmente pela adoção de um adequado manejo, mantendo baixa a pressão de infecção e a doença controlada.

Na avaliação dos resultados obtidos pelo perfil sorológico dos rebanhos foi observada soroconversão dos animais somente a partir da 13ª semana de idade, alcançando níveis altos de soropositividade na 15ª semana de idade, em resposta à infecção na sua forma subaguda. Estes fatos foram observados por Kuchiishi (2003), podendo ser explicado pelo período entre o contato do animal com o agente e o início da produção de anticorpos. Normalmente o período de infecção pelo agente ocorre entre a 4ª semana e 12ª semana de idade, coincidindo com o período de declínio do nível de anticorpos maternos (CHIERS et al., 2002), na qual alcançam níveis muito baixos entre a 8ª e 12ª semana de idade (GARDNER, 1991). O início da soroconversão depende do contato inicial do animal com o agente infeccioso e, segundo Andreasen et al. (2000), o período de soroconversão pode ter início a partir da 11ª até 16ª semana de idade, dependendo do sorotipo infectante.

No rebanho com infecção antiga foram observados níveis baixos de soroconversão (10% de positivos no ELISA), provavelmente em decorrência da tardia resposta imune dos animais à infecção, ou seja, na 17ª semana foi observado o período de maior difusão do agente no rebanho, comprovados pelos resultados da PCR, e os animais até a 19ª semana de idade não haviam soroconvertido. Neste caso, o indicado seria realizar sorologia nas semanas seguintes para observar a soroconversão. Outra explicação seria a capacidade do agente em colonizar o trato respiratório superior sem indução da soroconversão (MØLLER et al., 1993; SIDIBÉ et al., 1993), ou ainda, pela aleatoriedade das amostras.

O rebanho sem apresentação clínica da doença obteve sorologia positiva para *A. pleuropneumoniae*, mas como os animais não demonstraram sinais clínicos característicos da pleuropneumonia, a explicação pode estar no ótimo *status* imunológico do rebanho, tolerância a doença ou pela presença de amostras de baixa virulência.

O produto amplificado pela PCR proveniente de amostra de campo do rebanho com infecção antiga foi seqüenciado e apresentou uma similaridade de 93,39% com a seqüência do gene *cpxCB* do *A. pleuropneumoniae* depositada no *GenBank*®, confirmando a especificidade do *primer* utilizado no teste para a detecção do agente. Kuchiishi (2003) amplificou e sequenciou uma amostra proveniente de campo, na qual apresentou uma similaridade de 84% com a seqüência depositada no banco de dados.

## 7. CONCLUSÕES

- A otimização do teste de PCR<sub>cpx</sub> reduziu a presença de ampliações inespecíficas;
- A PCR<sub>cpx</sub> demonstrou ser um teste altamente específico mas pouco sensível na detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae* em amostras provenientes de campo;
- As reações de PCR podem sofrer influência de substâncias inibidoras presentes no tecido animal;
- O resultado positivo obtido na PCR é diretamente proporcional à quantidade de tecido tonsilar;
- A PCR foi mais sensível que o isolamento bacteriológico tradicional;
- A associação entre PCR e ELISA é o método de eleição para definir o *status* imune e sanitário do rebanho quanto à infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



## 8. BIBLIOGRAFIA

ANDREASEN, M.; NIELSEN, J.P.; BAEKBO, P.; WILLEBERG, P.; BOTNER, A. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.45, p.221-235, 2000.

ANGEN, Ø; JESSING, S. PCR tests for serotypes specific identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 18, 2004. **Proceedings...**Hamburgo: International Pig Veterinary Society, p.161, 2004.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M. Detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae* através da Reação em Cadeia da Polimerase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999. **Anais...**Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, p.149-150, 1999.

BARRY, T.; POWELL, R.; GANNON, F. A general method to generate DNA probes for microorganisms. **Bio/Technology**, v.8, p.233-236, 1990.

BÉLANGER, M.; BÉGIN, C.; JACQUES, M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. **Infection and Immunity**, v.63, n.2, p.656-662, 1995.

BERTRAM, T.A. A quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. **Veterinary Pathology**, v.22, p.598-609, 1985.

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

BLACKALL, P.J.; KLAASEN, H.L.B.M.; VAN DEN BOSCH, H.; KUHNERT, P.; FREY, J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. **Veterinary Microbiology**, v.84, p.47-52, 2002.

BLANCHARD, B.; KOBISCH, M.; BOVÉ, J.M.; SAILLARD, C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, p.15-20, 1996.

BOHRER, P.B. A suinocultura brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003. **Anais...Goiânia**: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, p.46-64, 2003.

ROWSKY, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; PIFFER, I.A.; OLIVEIRA, S.J. Pleuropneumonia suína: Isolamento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 3 no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1995, Blumenau. **Anais...Blumenau**: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1995.p.80.

BOSSÉ, J.T.; JANSON, H.; SHEEHAN, B.J.; BEDDEK, A.J.; RYCROFT, A.N.; KROLL, J.S.; LANGFORD, P.R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. **Microbes and Infection**, v.4, p.225-235, 2002.

BOSSÉ, J.T.; FRIENDSHIP, R.; ROSENDAL, S.; FENWICK, B.W. Development and evaluation of mixed-antigen ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, 5 and 7 infections in commercial swine herds. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.359-362, 1993.

CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11. p.246-251, 1999.

CHIERS, K.; DONNÉ, E.; VAN OVERBEKE, I.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.343-352, 2002.

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.

CHO, W.-S.; CHAE, C. PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* *apxIV* gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with *in situ* hybridization. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.56-60, 2003.

CHO, W.-S.; CHAE, C. Genotypic prevalence of *ApxIV* in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.175-177, 2001.

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

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

DREYFUS, A.; SCHALLER, A.; NIVOLLET, S.; SEGERS, R.P.A.M.; KOBISCH, M.; MIELI, L.; SOERENSEN, V.; HÜSSY, D.; MISEREZ, R.; ZIMMERMANN, W.; INDERBITZIN, F.; FREY, J. Use of recombinant *ApxIV* in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the *ApxIV* ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.99, p.227-238, 2004.

EHRlich, G.D.; GREENBERG, S.J. PCR-based diagnostics in infectious diseases. **Blackwell Scientific Publications**, 1994, 698 p.

ERLICH, H.A. **PCR technology: principles and applications for DNA amplifications**. New York: Oxford Press, 1989, 246 p.

FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.39, p.729-735, 1995.

FANO, E.; PIJOAN, C.; DEE, S. Evaluation of a Nested-PCR technique from nasal samples to identify *Mycoplasma hyopneumoniae* in live animals. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 18, 2004. **Proceedings...**Hamburgo: International Pig Veterinary Society, p.186, 2004.

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

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

FITTIPALDI, N.; BROES, A.; HAREL, J.; KOBISCH, M.; GOTTSCHALK, M. Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41; n.11; p.5085-5093, 2003.

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

FREY, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends in Microbiology**, v.3, n.7, p.257-260, 1995.

FREY, J.; NICOLET, J. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca<sup>2+</sup>. **Infection and Immunity**, v.56, p.2570-2575, 1988.

FREY, J.; BONE, J.T.; CHANG, Y.F.; CULLEN, J.M.; FENWICK, B.; GERLACH, G.F.; GYGI, D. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxins and their genes. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.1723-1728, 1993.

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, 1, p.251-254, 1998.

GRAM, T.; AHRENS, P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.443-448, 1998.

GRAM, T.; AHRENS, P.; NIELSEN, J.P. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.95-104, 1996.

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.

GOTTSCHALK, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* species in animal disease: a topical subject. **The Veterinary Journal**, n.159, p.5-7, 2000.

GOTTSCHALK, M., BROES, A., MITTAL, K.R., KOBISCH, M., KUHNERT, P., LEBRUN, A., FREY, J. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? **Veterinary Microbiology**. v.92, p.87–101, 2003.

GOTTSCHALK, M.; LASALLE, F.; RADACOVICI, S.; DUBREUIL, J.D. Evaluation of long-chain lipopolysaccharides (LPS-CL) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. **Veterinary Microbiology**, n.38, p.315-327, 1994.

GUNNARSON, A., BIBERSTEIN, E.I., HURVELL, B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*). Agglutination reactions. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, p.1111-1114, 1977.

HAESEBROUK, 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.

HAMER-BARRERA, R.; GODÍNEZ, D.; ENRÍQUEZ, V.I.; VACA-PACHECO, S.; MARTÍNEZ-ZÚÑIGA, R.; TALAMÁS-ROHANA, P.; SUÁREZ-GÜEMEZ, F.; GARZA, M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.68, p.33-41, 2004.

HIGUCHI R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.9, p.1026-1030, 1993.

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

HÜSSY, D.; SCHALLER, Y.; MISEREZ, R.; INZANA, T.; FREY, J. PCR-based identification of serotype 2 isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars I and II. **Veterinary Microbiology**, v.99, p.307-310, 2004.

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

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.; MA, J.; WORKMAN, T.; GOGOLEWSKY, R.P.; ANDERSON, P. Virulence properties and protective efficacy of capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. **Infection and Immunity**, v.56, n.8, p.1880-1889, 1988.

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.

JACQUES, M.; PARADIS, S.E. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, p.45-59, 1998.

JANSEN, R.; BRIAIRE, J.; KAMP, E.M.; *et al.* The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. **FEMS Microbiology Letter**, v.126, p.139-143, 1995.

JESSING, S.G.; ANGEN, Ø.; INZANA, T.J. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5 e 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41; n.9, p.4095-4100, 2003.

JUNG K, HA Y, KIM SH, CHAE C. Development of Polymerase Chain Reaction and comparison with in Situ Hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Veterinary Medicine Science**; v.66; n.7; p. 841, 2004.

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, p.3079-3085, 1991.

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

KICH, J.D.; PIFFER, I.A.; BARCELLOS, D.E.S.N; GUIDONI, A.L.; KLEIN, C.S.; FÁVERO, M.B.B.; VIZZOTTO, 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, 1, p.1-6, 2000.

KLEIN, C.S. Cápsula e superóxido dismutase como fatores de virulência em *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Porto Alegre, 2000. p.114. **Dissertação** (mestrado), programa de Pós-graduação em Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KLEIN, C.S.; PIFFER, I.A.; SILVA, S.C.; SCHRANK, A.; FÁVERO, M.B.B.; SCHRANK, I.S. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field



strains from healthy and diseased pigs. **Current Microbiology**, v.46, p.443-447, 2003.

KUCHIISHI, S. S. Avaliação de ensaio imunoenzimático indireto, isolamento bacteriológico tradicional e reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da pleuropneumonia suína. Jaboticabal, 2003, p.72. **Dissertação** (mestrado) programa de pós-graduação em Clínica Médica Veterinária. Universidade Estadual Paulista, 2003.

LEUTENEGGER, C.M. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. **Veterinary Sciences Tomorrow**, v.1, 2001.

LI, H.; GYLLENSTEN, U.B.; CUI, X.; SAIKI, R.K.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Amplification and analysis of DNA sequences in a single human sperm and diploid cells. **Nature**, n.335, p.414-417, 1988.

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, p.1704-1710, 1998.

LOCATELLI, J.C.; MACHADO, A.; SÁ E SILVA, A.; BARCELLOS, D.E.S.N. Ocorrência da pleuropneumonia suína causada pelo *Haemophilus pleuropneumoniae*. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 6., 1981, Gramado. **Anais...**Gramado: Sociedade Veterinária do Rio Grande do Sul e Associação dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 1981.p.36-37.

MACHADO, H.G. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico de infecções provocadas pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. Pelotas, 1997.p.90. **Dissertação** (Mestrado), curso de Pós-graduação em Sanidade Animal. Universidade Federal de Pelotas (RS), 1997.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONKANY, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: a practice approach. **Journal Clinical and Laboratorial Analyses**, v.16, p.47-51, 2002.

MATHEWS, P.R.J.; PATTISON, I.H. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pelurisy in the pig. **Journal of Comparative Pthology**, v.51, p.44-52, 1961.

MØLLER, K.; ANDERSEN, L.V.; CHRISTENSEN, G.; KILIAN, M. Optimalization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. **Veterinary Microbiology**, v.36, p.261-271, 1993.

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

MØLLER, K., FUSSING, V.; GRIMONT, P.A.D.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, E.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 fo Sistematic Bacteriology**, v.46. n.4, p.951-956, 1996.

MORES, N.; SOUZA, J.C.A.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental a pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). Patogenicidade e evolução das lesões anatomo-patológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, n.6, p.679-693, 1984.

MURDOCH, D.R. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. **Medical Microbiology**, n.36, p.11620-1170, 2003.

NAKAI, T.; ONO, K.; IKE, K.; KUME, K. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by use of purified capsular polysaccharide or lipopolysaccharide. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 12., 1992. The Hague. **Proceedings...**The Hague: INTERNATIONAL Pig Veterinary Society, 1992,p.186.

NICOLET, J. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation Sérologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie (A)**, v.216, p.487-495, 1971.

NICOLET, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: LEMAN, et al.. **Diseases of Swine**. Iowa, Iowa State University Press, p.401-413, 1992.

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

ORLANDER, H.I. A septicemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*. PhD. **Thesis**, University of California, Davis, 1963.

PIFFER, I.A. Sorotipos de *Haemophilus pleuropneumoniae* isolados de suínos em Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: Simpósio do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, 3., Concórdia, 1983. **Anais: ...Concórdia, III Simpósio do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves**. P.335-338, 1983.

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

PIFFER, I.A.; BRITO, M.A.V.P.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I. Pleuropneumonia suína, I. Alguns aspectos epidemiológicos da doença em nosso meio. In:

Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 18., Balneário Camboriú, 1982. **Anais...**Balneário Camboriú, 18º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1982, p.45.

PIFFER, I.A.; GUIDONI, A.L. Diagnóstico sorológico: títulos, testes e verdades – uma interpretação racional. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 8., Foz do Iguaçu, 1997. **Anais ...**Foz do Iguaçu: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1997, p.95-102.

PIFFER, I.A.; KLEIN, C.S.; FÁVERO, M.B.B.; FIGUEIREDO, J. 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.

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 desoxyribonucleic acid relatedness. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, p.510-514, 1983.

PORKWORD. Disponível em: <http://www.porkword.com.br>. Acesso em 04 de dezembro de 2003.

REIMER, D.; FREY, J.; JANSEN, R.; VEIT, H.P.; INZANA, T.J. Molecular investigation of the role of ApxI e ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. **Microbiology Pathogeny**, v.18, p.197-209, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second edition. V.3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.16-9.19.

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., DJORDJEVIC, S.P., EAMENS, G.J., FORBES, W.A., KUHN, R., KUHNERT, P., GOTTSCHALK, M., NICOLET, J., FREY, J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.47–62, 2001.

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

SCHALLER, A., KUHNERT, P., de, I.P.-R.V., NICOLET, J., FREY, J. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.365–376, 2000.

SCHUCHERT, J.A.; INZANA, T.J.; ANGEN, Ø; JESSING, S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 8 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p.4344-4348, 2004.

SEBUNYA, T.N.K.; SAUNDERS, J.R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. **Journal the American Veterinary Medical Association**, v.182, 12, p.1331-1337, 1983.

SHOPE, R.E. Porcine contagious pleuropneumonia. 1. Experimental transmission, etiology, and pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v.119, p.357-368, 1964.

SIDIBÉ, M.; MESSIER, S.; LARIVIERE, S.; GOTTSCHALK, M.; MITTAL, K.R. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract as a complement to serological tests. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, p.204-208, 1993.

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, p.1183-1187, 1991.

SOBESTIANKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e Patologia Suína**, 2.ed. Goiânia, Art 3 Impresses Especiais, 1999. p.353-358.

STARNBACH, M.N.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.6, p.1257-1261, 1989.

STHITMATEE, N.; SIRINARUMITR, T.; MAKONKEWKEYOON, L.; SAKPUARAM, T.; TESAPRATEEP, T. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-*cpx* genes. **Molecular and Cellular Probes**, v.17, p.301-305, 2003.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation – PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1742-1749, 1994.

TANG, Y. W.; POCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostic of infectious diseases. **ACTA Veterinaria Hungarica**, v.43, n.11, p.2021-2038, 1997.

TASCÓN, R. I.; VASQUEZ-BOLAND, J. A.; GUTIÉRREZ-MARTIN, C. B.; RODRIGUEZ-BARBOSA, I.; RODRIGUEZ-FERRI, E. F. The RTX haemolysins apxI and apxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. **Molecular Biology**, v.14, p.207-216, 1994.

TAYLOR, D.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.). **Diseases of Swine**, Ames : Iowa State University Press, p. 343–354, 1999.

TU, A. H. T.; HAUSLER, C.; YOUNG, R.; STRUCK, D. K. Differential expression of the cytotoxic and hemolytic activities of the ApxIIA toxin from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.62, p.2119-2121, 1994.

UDEZE, F.A.; LATIMER, K.S.; KADIS, S. Role of *Haemophilus* endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus*. **American Journal of Veterinary Research**, n.8, p.768-773, 1987.

VERDIN, E.; SAILLARD, C.; LABBÉ, A.; BOVÉ, J.M.; KOBISH, M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.31-40, 2000.

WARD, C. K.; INZANA, T. J. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bacterial antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v.153, p.2110-2121, 1994.

WILSON, IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environment Microbiology**, v. 63, n.10, p.3741-3751, 1997.

ZEEH, F.; KUHNERT, P.; MISEREZ, R.; DOHERR, M.; ZIMMERMANN, W. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine nasal swabs using Real Time PCR. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 18, 2004. **Proceedings**...Hamburgo: International Pig Veterinary Society, p.178, 2004.



## **ANEXO I**

### **Meio de Nicolet**

- PPLO ágar: 37g/litro;
- 5% de soro bovino esterilizado por filtração;
- 5% de extrato de levedura esterilizado por filtração.

Esterilizar o meio de PPLO em autoclave a 121°C por 15 minutos e acrescentar o soro bovino e o extrato de levedura esterilizado.

### **Extrato de levedura**

- 50 gramas de fermento biológico fresco (Itaquara, São Paulo) em 100 mL de solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0,2 M.

Aquecer à 80°C por 20 minutos e filtrar em gaze. Filtrar o sobrenadante com filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro dos poros. Conservar o filtrado à -20°C.

## ANEXO II

### Preparo do meio de LB<sup>2</sup>

- meio BHI;
- 5% de soro equino;
- 100 µg de NAD/mL;
- 0,5 µg de lincomicina/mL;
- 1,5 µg de bacitracina/mL.

Preparar o meio de BHI, esterilizá-lo em autoclave a 121°C por 15 minutos e acrescentar os demais ingredientes esterilizados por filtração com membrana de 0,22 µm de diâmetro dos poros.

2

---

<sup>2</sup>Pi Joan et al., 1983

## ANEXO III

### Preparo do meio de CVLB<sup>3</sup>

- PPLO ágar: 37g/litro;
- 2 µg de cristal violeta;
- 1 µg de lincomicina;
- 2 µg de bacitracina;
- 2 µg de NAD.

Preparar o meio de BHI, esterilizá-lo em autoclave A 121°C por 15 minutos e acrescentar os demais ingredientes esterilizados por filtração com membrana de 0,22 µm de diâmetro dos poros.

3

---

<sup>3</sup> Sidibé et al., 1983, modificado por Kich, (1996)

## ANEXO IV

### Tampão para corrida eletroforética (TEB 5X)

- 54 g de Tris;
- 27,5 g de ácido bórico;
- 20 mL de EDTA 0,5M (pH 8,0);
- Água deionizada para 1000 mL.

É realizada diluição do tampão para 1X para corrida eletroforética.

## ANEXO V

## Resultados das colheitas da inoculação experimental por animal:

Tempo (dias PI)	Animal	Material			
		Suabe (salina)	Suabe (LB)	Biopsia (salina)	Biopsia (LB)
15	<sup>1</sup> 905	+	+	+	+
	<sup>2</sup> 906	-	+	+	-
	<sup>3</sup> 907	+	+	+	-
	<sup>4</sup> 909	+	+	+	+
30	905	-	-	-	-
	906	+	+	-	-
	907	-	-	-	-
	909	+	-	+	+
45	905	-	+	-	-
	906	-	-	-	-
	907	-	-	-	-
	909	-	-	-	-
60	905	-	-	-	-
	906	-	-	-	-
	907	-	-	-	-
	909	-	-	-	-
75	905	-	-	-	-
	906	-	-	-	-
	907	-	-	-	-
	909	-	-	-	-

<sup>1</sup> Animal inoculado com diluição bacteriana  $10^2$  UFC/mL;

<sup>2</sup> Animal inoculado com diluição bacteriana  $10^4$  UFC/mL;

<sup>3</sup> Animal mantido em contato;

<sup>4</sup> Animal inoculado com diluição bacteriana  $10^8$  UFC/mL.

## ANEXO VI

Especificações dos *primers* utilizados na PCR *cpx*

Especificações dos *primers* utilizados na PCR para identificação de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Lo et al, 1998).

<i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeos	Tamanho do <i>primer</i> (pb)	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>cpx</i> - UP	5'TGGCGATACCGGAAACAGAGTC 3'	22	715
<i>cpx</i> - DO	5'GCGAAAGGCTATGGTATGGGTA TGG3'	25	715

pb: pares de bases.

A: timina;

C: citosina;

G: guanina;

T: timina.

## ANEXO VII

### Protocolo de extração de DNA

(Fan et al. (1995) modificada por Kushiichi (2003))

- retirar 1 mL do cultivo e centrifugar por 5 minutos à 14.000 rpm;
- descartar sobrenadante e acrescentar 1 mL de salina com 0,5% de *Tween* 20 ao *pellet*, agitar e centrifugar por 5 minutos;
- descartar o sobrenadante novamente e acrescentar 200 µL de PBS pH 7,2;
- centrifugar mais 10 minutos;
- descartar sobrenadante e adicionar 200 µL de água ultrapura;
- submeter o sobrenadante a 100°C por 10 minutos e colocar imediatamente sobre gelo por 5 minutos e centrifugada.
- aliquotar as amostras de DNA em 200 µL e armazenar à temperatura de -20°C.

## ANEXO VIII

Protocolo final da técnica de PCR *cpx*:

Componentes da reação de PCR para amplificação do DNA de *A. pleuropneumoniae* com respectivos volumes e concentrações.

Componente	Volume na reação	Concentração final
Tampão <i>Taq</i> (Tris - HCl pH 8,3 e KCl)	2,5 µL	Tris - HCl (10 mM) KCl (50 mM)
MgCl <sub>2</sub>	1 µL	2,5 mM
dNTP's	5 µL	200 µM (cada)
<i>Primer cpx</i> UP	1 µL	30 pmol
<i>Primer cpx</i> DO	1 µL	30 pmol
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,2 µL	1 U
<i>Platinum® Taq Antibody</i>	0,2 µL	1 U
Água ultrapura	9,1 µL	-
Amostra de DNA	5 µL	-
Total	25 µL	-

dNTP's: desoxinucleotídeo trifosfatado;

*cpx*: gene responsável pelo transporte de cápsula.

Processo de amplificação (condições de temperatura e tempo):

-etapa de desnaturação do DNA: 94°C por 5 minutos;

-etapa de amplificação do DNA: 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 57°C durante 45 segundos, polimerização a 72°C por 2 minutos;

-etapa final: anelamento dos *primers* a 57°C por 5 minutos e polimerização a 72°C por 10 minutos.

A cada amplificação realizada foram adicionados um controle positivo (amostra de referência de *A. pleuropneumoniae*) e um controle negativo (reação de PCR sem amostra de DNA).





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)