

LUCAS FERNANDO DOS SANTOS

ESTUDO FILOGENÉTICO DO GENE *apxIA* DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SOROTIPO 5 ISOLADOS NO BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

LUCAS FERNANDO DOS SANTOS

ESTUDO FILOGENÉTICO DO GENE *apxIA* DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SOROTIPO 5 ISOLADOS NO BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de Abril de 2011.

Prof^a. Denise Mara Soares Bazzolli

Prof. Walter Vieira Guimarães
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela benção em mim depositada na conquista de mais essa vitória.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária pela oportunidade.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Maria Aparecida “Cidinha”, pela confiança, conselhos, ensinamentos e preocupação.

Ao Pedro Marcus pela colaboração nas análises filogenéticas, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Walter pela co-orientação, disponibilidade e conselhos.

À Profª Flavia Passos pela co-orientação e conselhos.

À Profª Denise pelos ensinamentos transmitidos no decorrer do curso.

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

Aos meus irmãos Daniel e Victor, pela força, pelas brigas e por poder sempre contar com vocês.

A minha querida Vó Zita pelo amor incondicional, pela dedicação e pelas orações.

A Kledna, Mayka e João Paulo pela força, compreensão e ajuda no laboratório.

A todos os funcionários da Microvet, em especial a Arlete, Arlindo, Daniela, Camila, Fábio e Valéria, pela força e colaboração no desenvolvimento deste trabalho

Aos amigos de faculdade Mococa, Alberto, Jura, Bruna, João e Vivian pela boa convivência, amizade e pela torcida

A Isabela pela torcida, amizade e todo carinho dedicado a mim.

À querida Rose que muito me ajudou com prazos, matrículas, solicitações, bolsa e pela amizade e disponibilidade de sempre me ajudar.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Veterinária pelos conhecimentos transmitidos e por toda colaboração.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	v
Lista de quadros	vi
Lista de tabelas.....	vii
Resumo	viii
Abstract	x
1 – Introdução	1
2 – Revisão de Literatura	2
2.1 – Pleuropneumonia suína	2
2.2 – Etiologia	5
2.3 – Epidemiologia	6
2.4 – Fatores de virulência	7
2.5 – Características moleculares do <i>Actinobacillus pleuropneumonia</i>	12
3 – Objetivos	13
3.1 – Objetivos específicos	14
4 – Material e métodos	14
4.1 – Microorganismos utilizados, condições de cultivo e manutenção	14
4.2 – Extração de DNA	15
4.3 – Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	15
4.3.1 – <i>Primers</i>	15
4.3.2 – Condições de amplificação	16
4.3.3 – Detecção do produto amplificado	17
4.4 – Sequenciamento e caracterização dos genes <i>apxIA</i>	17
4.4.1 – Sequência de DNA reconstruído a partir de um conjunto de fragmentos de DNA que se sobrepõem	19
4.4.2 – Alinhamento das sequências	20

4.6 – Análise filogenética	20
4.7 – Obtenção da rede de haplótipos	20
5 – Resultados	21
5.1 – PCR para identificação do App sorotipo 5	21
5.2 – PCR para amplificação do gene <i>apxlA</i>	21
5.3 – Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos	23
6 – Discussão	31
7 – Conclusões	35
8 – Perspectivas futuras	36
9 – Referência bibliográfica	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Organização do operon *apxl* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.....11
- Figura 2:** Representação esquemática dos *primers* utilizados para o seqüenciamento do gene *apxlA* de isolados brasileiros de APP sorotipo 5 e os respectivos sentidos de replicação.....19
- Figura 3:** Confirmação dos isolados de App sorotipo 5 pela identificação do gene *cps* sorotipo específico21
- Figura 4:** – Isolamento do fragmento de 723pb do gene *apxlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando os primers ApxIA F/ ApxIA R22
- Figura 5:** Isolamento do gene *apxlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando os *primers* pET *apxlA* F/ pET *apxlA* R22
- Figura 6:** Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana das 45 seqüências do gene *apxlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.....24
- Figura 7:** Rede de haplótipos das seqüências brasileiras do gene *apxlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5 construída pelo aplicativo Network 4.6.0.0.O tamanho das circunferências é proporcional às freqüências relativas dos haplótipos.....27
- Figura 8 :** – Localização de polimorfismos de aminoácidos da toxina ApxI entre os isolados brasileiros de App e as seqüências disponíveis no GenBank (NCBI), agrupados de acordo com os haplótipos e o grupo filogenético.....30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Seqüência dos *primers* utilizados para identificação do sorotipo 5 App 5 e para detecção e seqüenciamento do gene *apxIA* – *ApxIA*, *pETapxIA*16

Quadro 2: Seqüência dos pares de *primers* utilizados para o seqüenciamento dos isolados18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfis da produção de toxinas Apx entre os sorotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	12
Tabela 2: Classificação das seqüências com suas respectivas freqüências de haplótipos, estados brasileiros e grupo filogenético.....	25
Tabela 3: Classificação das sequências de acordo com o sistema de criação de suínos, propriedade, ano de isolamento, haplótipos e grupos filogenéticos	28

RESUMO

SANTOS, Lucas Fernando, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2011. **Estudo filogenético do gene *apxIA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5 isolados no Brasil.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-orientadores: Flávia Maria Passos Lopes Passos e Walter Vieira Guimarães.

As toxinas produzidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) são, reconhecidas como os principais fatores de virulência encontrados neste patógeno. A toxina Apx I apresenta forte atividade hemolítica e citotóxica sendo considerada a exotoxina que apresenta maior atividade citotóxica contra macrófagos pulmonares e neutrófilos em suínos. Essa exotoxina é produzida por diferentes sorotipos de App, 1, 5, 9, 10, 11 e 14, sendo estes envolvidos com a maioria dos casos clínicos graves reportados. Em geral, essas toxinas são codificadas por *operons* constituídos por quatro genes: C, A, B e D, onde o gene A codifica a proteína estrutural. As bases moleculares da evolução e a diversidade genética existente entre os sorotipos de App ainda não estão bem compreendidas. Uma das possíveis explicações para esse fato pode ser pela reduzida disponibilidade de seqüências gênicas dessa bactéria em bancos de dados públicos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo sequenciar o gene *apxIA* e avaliar a diversidade genética desse gene de isolados brasileiros de App com as seqüências de referência disponíveis no banco de dados Genbank (NCBI). Neste trabalho, foram analisados 42 isolados brasileiros de App sorotipo 5A e 5B. As seqüências destes isolados foram comparadas a outras seqüências disponíveis nos bancos de dados GenBank utilizando o programa MUSCLE 3.8.31 e os polimorfismos das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram analisados. O modelo de substituição de nucleotídeos empregado foi o F81+I+G, estimado a partir do conjunto de seqüências alinhadas utilizando o programa jModeltest 0.1.1. Os resultados evidenciaram a presença de polimorfismos nas seqüências brasileiras que permitiram agrupar os 41 isolados, em 14 haplótipos (grupos de seqüências com 100% de identidade) diferentes. Os isolados brasileiros foram agrupados em dois grupos (1 e 2), sendo distinguidos por mutações nos resíduos de aminoácidos 2 e 3 da proteína ApxI. Esses resultados indicam a existência de uma diversidade

gênica entre os isolados brasileiros de App e auxiliarão no desenvolvimento de candidatos vacinais mais eficientes.

ABSTRACT

SANTOS, Lucas Fernando, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April de 2011. **Phylogenetic analysis of the *apxlA* gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 5, isolated in Brazil** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-adviser: Flávia Maria Passos Lopes Passos and Walter Vieira Guimarães.

The toxins produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) are recognized as major virulence factors found in this pathogen. Apx toxin I has strong hemolytic and cytotoxic activity, and this toxin has a high cytotoxic activity against pulmonary macrophages and neutrophils in swine. This exotoxin is produced by different serotypes, including the serotypes 1, 5, 9, 10, 11 and 14, which are involved with the most severe reported clinical cases. In general, these toxins are encoded by *operons* consisting of four genes: C, A, B and D, where the gene A encoding the structural proteins. The molecular basis of evolution and genetic diversity among the serotypes of App are not well understood. One of the possible explanations for this can be unavailability of DNA sequences of this bacteria in public databases. Thus, this study aimed to sequence the gene *apxlA* and assess the genetic diversity of this gene in isolates of the App with reference sequences available in GenBank (NCBI). In this study, we analyzed 42 isolates of serotype App 5A and 5B. The sequences of these isolates were compared with other sequences available in GenBank databases using the program MUSCLE 3.8.31 and polymorphisms of the nucleotide and amino acid sequences were analyzed. The nucleotide substitution model used was F81 + I + G, estimated from the set of sequences aligned using the program jModeltest 0.1.1. The results showed the presence of differences in the ApxI sequences that allowed group the 41 Brazilian isolates in 14 haplotypes (groups of sequences with 100% identity). Brazilian isolates were grouped into two groups (1 and 2), being distinguished by mutations in the amino acid residues 2 and 3 of protein ApxI. These results indicate the existence of a genetic diversity among isolates of App and can assist in the development of more efficient vaccine candidates

1 – INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína mais consumida no mundo, com uma produção de 101 milhões de toneladas, sendo quase a metade produzida na China e outro terço na União Européia e nos Estados Unidos da América. A participação do Brasil tem crescido em importância no mercado mundial. O país é o quarto maior produtor, com 3% da produção e 10% das exportações (ABIPECS a, 2010).

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPECS), o ano de 2010, para o setor de carne suína, teve como principal característica a estabilidade dos volumes produzidos e uma forte recuperação da lucratividade. Sendo que a produção, em 2010, cresceu 1,5 % em relação a 2009, passando de 3,19 milhões de toneladas para 3,24 milhões de toneladas. Porém a crise financeira de 2008/2009 afetou os volumes e os preços das exportações, em 2010. Houve uma evolução dos preços praticados de 23,3% em relação ao ano anterior. O comércio internacional de carne suína brasileira movimentou 504 mil toneladas de carne e gerou uma receita anual aproximada de 1,3 bilhões de dólares. Sendo que essa exportação está concentrada na Federação Russa e Hong Kong.(ABIPECS,2010)

Com a criação intensiva de suínos houve um aumento das ocorrências de doenças respiratórias em todos os criatórios de suínos e conseqüentemente, no custo da produção. Entre as principais doenças respiratórias que afetam esses animais, a pleuropneumonia suína é uma das mais importantes doenças bacterianas, estando presente na suinocultura de todos os países produtores, e é responsável por grandes perdas econômicas e sérios prejuízos nos sistemas de criação (Taylor 2006).

A pleuropneumonia suína causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) é uma doença contagiosa, fibrinosa, hemorrágica e necrosante. Alguns fatores de virulência foram identificados nessa bactéria, são eles: cápsula, lipopolissacarídeos, proteínas de membrana externa e quatro toxinas Apx (Bossé *et al.*, 2002), que são membros da família de toxinas RTX. Alguns estudos indicam que a virulência do App está fortemente relacionada com as toxinas Apx (Tascon *et al.*,1994, Beck *et al.*,1994, Fuller *et al.*, 2000).

Atualmente são reconhecidos 15 sorotipos diferentes de App (Blackall *et al.* 2002), e estes secretam diferentes combinações das quatro citotoxinas: Apx I, Apx II, Apx III e Apx IV. Segundo Frey em 1995, as toxinas Apx I e Apx II foram descritas como as mais virulentas e os melhores antígenos protetores. Apx I é produzida pelos sorotipos 1, 5, 9, 10, 11 e 14, essa proteína é fortemente hemolítica e apresenta um forte citotoxicidade contra macrófagos pulmonares e neutrófilos em suínos (Frey, 1995).

Em App as toxinas Apx são codificadas por um operon que consiste dos genes C, A, B e D. O gene A codifica a proteína estrutural da toxina, e a toxicidade dela é obtida através da ativação do gene C. O produto dos genes B e D auxiliam na secreção da proteína.

As bases moleculares da evolução e a diversidade genética existente entre os isolados de App ainda não estão bem compreendidas. Uma possível explicação seria pela reduzida disponibilidade de seqüências gênicas dessa bactéria em bancos de dados públicos. Devido à grande imunogenicidade da toxina ApxI (Frey,1995) este trabalho tem como objetivo sequenciar o gene *apxIA* e avaliar a diversidade genética desse gene de isolados brasileiros de App sorotipo 5A e 5B e compará-los com as seqüências de referência disponíveis no banco de dados Genbank.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Pleuropneumonia suína

A pleuropneumonia suína é uma enfermidade respiratória causada pela bactéria gram-negativa *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bendixen *et al.*, 1981), sendo caracterizada pelo desenvolvimento de uma broncopneumonia necrosante e hemorrágica, com exsudação de fibrina, causando pleurite. Esta patologia apresenta uma incidência crescente devido à intensificação e massificação das criações de suínos. A apresentação severa e muitas vezes, fatal dessa doença determina prejuízos a indústria suinícola, além de limitar o processo de exportação e importação de carne suína. (Mores *et al.*,1984; Fenwick & Henry, 1994; Desrosiers,1998). Sua presença é documentada em

todos os países onde a indústria suinícola é importante (Rosendal & Boyd,1982; Desrosiers; 1986, Straw *et al.*,1989; Rodríguez-Ferri, 2002).

No Brasil, pesquisadores da Embrapa suínos e aves, em 2008, identificaram o complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) que foi definido como o resultado de uma combinação de agentes patogênicos e ocorre principalmente em granjas de suínos que não controlam os fatores de risco associados às doenças respiratórias com aumento da morbidade e mortalidade especialmente nas fases de crescimento e terminação. O CDRS tem sido verificado em granjas de suínos, onde o circovírus suíno tipo 2 - PCV2 aparece em associação com outros agentes como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e App. Embora cada patógeno esteja relacionado a uma doença específica, a gravidade da apresentação depende da relação de forças entre agente e hospedeiro (Kich e Mores, 2008). A ausência de medicação nas rações de terminação visando às exportações e o controle de resíduos em carcaças, o difícil controle da doença via vacinação com a utilização de vacinas disponíveis no mercado, levaram ao aumento das doenças respiratórias dos suínos, dentre elas, a pleuropneumonia suína (Kich e Mores, 2008).

As perdas econômicas relacionadas à pleuropneumonia suína são devido ao prejuízo em consequência das perdas de animais pela alta mortalidade, redução na produtividade, aumento na conversão alimentar, nos gastos com tratamento e vacinação, a presença de lesões nas carcaças que implica em condenação total ou parcial (Piffer *et al.*, 1997; Taylor, 2006). Segundo Straw *et al.*,(1989), a pleuropneumonia ocasiona, em média, uma redução no ganho de peso diário de 34% e um aumento de 26% na conversão alimentar. A mortalidade varia de 10 a 20% durante os surtos, porém é usualmente menor que 1% em rebanhos cronicamente infectados (Cristensen *et al.*,1999). Surtos da doença promovem um aumento de 38% nas despesas devido ao tratamento e perdas de animais (Protas *et al.*, 1985). Lesões como pleurite e hepatização pulmonar, decorrentes da infecção, afetam mais de 10% do parênquima pulmonar reduzindo em 14,7% o desenvolvimento do suíno infectado (Piffer *et al.*, 1985).

As pneumonias determinam elevados prejuízos à suinocultura comercial, sendo sua ocorrência favorecida pelo sistema de produção, tipicamente intensivo. Os sistemas de criação de suínos encontrados no Brasil são o de criação independente, onde é encontrado o sistema de ciclo completo composto pelos setores de gestação, maternidade, creche, recria e terminação. E o sistema de integração, praticado pelas principais empresas alimentícias, composto basicamente por duas unidades: uma de produção de leitões (UPL) e uma unidade terminadora. No período de 1999 a 2001, a prevalência de pneumonia em suínos abatidos no Brasil foi de 75,70% (Silva *et al.*, 2001). A pleuropneumonia suína é uma das mais importantes, apresentando prevalência de 42,86% no Brasil (Moreno *et al.*, 1999).

A introdução de animais portadores pode ser a causa da disseminação do patógeno pela granja. Essa transmissão ocorre por via respiratória através do ar, por curtas distâncias (Torremorell *et al.*, 1997; Savoye *et al.*, 2000), por transmissão indireta de exsudados contaminados procedentes de suínos com infecção aguda ou através dos funcionários das granjas. Em geral, acredita-se que o agente penetra nas vias respiratórias por inalação, coloniza as tonsilas e chega aos alvéolos pulmonares através da traquéia e dos brônquios (Muñoz, 2003).

Os sintomas clínicos da pleuropneumonia suína variam em função do estado imunológico dos animais, do estresse produzido por condições ambientais adversas, do grau de exposição ao agente infeccioso e da cepa infectante (Maes *et al.*, 2001). A enfermidade pode acometer suínos de todas as idades, sendo os animais de recria e engorda (2 a 6 meses de idade) os habitualmente afetados de forma mais aguda (Taylor *et al.*, 2006).

Do ponto de vista da sintomatologia clínica, a enfermidade pode se apresentar sob as formas superaguda, aguda e crônica (Santos *et al.*, 2007). Na forma superaguda, observam-se extensas hemorragias e exsudações fibrinosas no parênquima pulmonar e na cavidade pleural, definidos como uma pleurite fibrinosa e pneumonia necrosante e hemorrágica que produz morte do animal em um período de 24 a 48 horas. A forma aguda se caracteriza por uma intensa resposta inflamatória, com hemorragias, edemas e exsudação fibrinosa, podendo provocar morte em poucos dias. Os animais que sobrevivem à enfermidade podem se transformar em portadores crônicos do patógeno,

podendo ser assintomáticos. Como conseqüência de outras infecções ou do estresse provocado pelo transporte, esses animais podem sofrer de enfermidade aguda desenvolvendo lesões crônicas, com necrose pulmonar, abscessos e aderências fibrinosas na cavidade pleural (Nicolet, 1992). Estas lesões só podem ser avaliadas após o abate, portanto esses animais tendem a ter um índice de crescimento menor e constituem um foco de infecção da doença.

É possível que a infecção por App se converta em endêmica em determinadas granjas, principalmente nas de ciclo completo. Nessas granjas, as matrizes transmitem juntamente com os anticorpos maternos, o patógeno a sua progênie, o que leva a um estado de equilíbrio que evita a infecção generalizada, até que o título de anticorpos maternos nos leitões reduza a índices abaixo do limite protetor. Nesse momento, o patógeno coloniza as vias respiratórias inferiores e gera uma nova situação que, em função de uma série de fatores, conduzem a um infecção aguda ou crônica (Chiers *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Sjolund e Wallgren. em 2010, demonstrou que a utilização de uma vacina comercial contendo três exotoxinas inativadas (ApXI, ApXII e ApXIII) e uma proteína de membrana (OMP) de 42 kDa foi ineficaz no controle de um surto de pleuropneumonia suína na Suécia. Sendo necessário o uso de antimicrobianos no controle da doença.

2.2 – Etiologia

O App é uma bactéria cocobacilar, gram negativa, capsulada, microaerófila, imóvel, não formadora de esporos e suas colônias produzem hemólise completa em agar sangue denominada de zona β - hemolítica (Sebunya e Saunders, 1983). Os sorotipos podem ser divididos em dois grupos baseados na dependência do fator V de crescimento: biótipo 1, na qual requer obrigatoriamente o fator de crescimento (β -NAD-dependente) e biótipo 2, β -NAD-independente (Pohl *et al.*, 1983). Os sorotipos pertencentes ao biótipo 1 são mais virulentos quando comparados com o biótipo 2 (Nicolet, 1992; Dom e Haesebrouck, 1992).

O App é identificado bioquimicamente pela produção de hemólise em agar sangue, teste de *Christie, Atkin, Munch-Peterson* (CAMP) positivo

(sinergismo das hemolisinas com a β -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, trealose e ausência de hidrólise pela α -fucosidase (Møller e Kilian, 1990).

2.3 – Epidemiologia

O estudo epidemiológico da infecção é necessário para que se consiga determinar o impacto da doença e identificar novas abordagens de prevenção e controle. 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, chamados de sistema de Integração, uma granja abriga animais de origem e idades diferentes, oferecendo a oportunidade da infecção endêmica tornar-se epizootica, ou seja, apresentar uma forte variação na sua ocorrência em períodos sucessivos dentro de um mesmo rebanho ou propriedade (Fenwick e Henry, 1994).

O padrão de distribuição dos sorotipos no mundo varia de um país para outro, sendo que poucos sorotipos predominam numa determinada região geográfica e um mesmo rebanho pode ser contaminado por diferentes isolados do mesmo sorotipo ou diversos sorotipos (Sebunya & Saunders, 1983; Inzana, 1991; Chatellier *et al.*, 1999). Algumas cepas podem apresentar-se pouco virulentas em determinados continentes e epidêmicas em outras situações (Nicolet, 1992)

A determinação do sorotipo é importante para o controle epidemiológico de rebanhos e monitoramento da dispersão ou introdução de novas cepas (Lo *et al.*, 1998). O conhecimento da distribuição dos sorotipos é importante na aplicação de vacinas, pois as vacinas inativadas protegem apenas contra os sorotipos que a constituem (Nielsen *et al.*, 1976; Nielsen, 1984).

De acordo com Kuchiishi (2007) os sorotipos 3, 5 e 6 e 10 são os 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 frequente 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 (Chiers *et al.*, 2002), constituindo o 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 rebanhos onde a doença é enzootica, ocorre de forma estável em períodos sucessivos, 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 endemicamente infectados, qualquer mudança de manejo, ambiente ou fatores que gerem estresse e declínio da imunidade no animal, pode desencadear a doença clínica severa (Fenwick e Henry, 1994).

2.4 - Fatores de virulência

Os fatores de virulência do App que interferem no desenvolvimento da doença são numerosos e o papel que cada um desempenha na patogenicidade ainda não está totalmente esclarecido (Muñoz, 2003). As diferenças observadas na virulência entre os diversos sorotipos são devido à estrutura capsular, composição do LPS, e exotoxinas secretadas (Perry *et al.*, 1990;. Ward e Inzana, 1997;. Taylor, 2006). O estado imunológico dos animais e a condição geral do rebanho também podem determinar o potencial de virulência de uma cepa específica (Gottschalk, 2007).

Alguns fatores de virulência como fímbrias e a formação de biofilme podem ser responsáveis pela adesão de App no trato respiratório inferior. As bactérias se ligam preferencialmente ao muco, proteínas e células do trato respiratório inferior, tais como células ciliadas dos bronquíolos terminais e células epiteliais alveolares (Chiers *et al.*, 2010).

Fímbrias

As fímbrias são conhecidas pelo seu envolvimento na adesão de diversos patógenos. Fímbrias do Tipo 4 são identificadas em App (Van

Overbeke *et al.*,2002). Boekema *et al.*,2003 demonstraram que a produção de fimbrias do tipo 4 são induzidas pelo contato com células epiteliais *in vitro* e durante a infecção pulmonar *in vivo*, sugerindo seu possível papel na adesão.

Biofilme

A colonização dos tecidos do hospedeiro por bactérias muitas vezes pode ser mediada pela formação de biofilmes. Os biofilmes são colônias associadas de bactérias na superfície do tecido embebidas em matrizes poliméricas produzidas por elas próprias. Produção de biofilmes tem sido descrita em muitos sorotipos de App e acredita-se que desempenhe um papel na colonização (Kaplan *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2005; Labrie *et al.*, 2010). Izano *et al.*, 2007 identificou poli-N-acetilglicosamina (PGA), como a principal polissacarídeo responsável pela formação do biofilme em App. Buettner *et al.*, 2008 demonstraram que uma cepa mutante deficiente na formação de biofilme foi menos virulenta. O papel da formação de biofilme na colonização pelo patógeno em estudo precisa ser melhor esclarecido.

Polissacarídeo Capsular (CPS)

O polissacarídeo capsular (CPS) de App é constituído de estruturas específicas responsáveis pela caracterização antigênica dos 15 sorotipos reconhecidos até agora (Jessing *et al.*, 2008). A cápsula também é o principal componente da bactéria contra as defesas do hospedeiro, tais como fagocitose e a resposta mediada pelo complemento. (Dubreuil *et al.*, 2000). De acordo com as diferenças estruturais encontradas nos diferentes sorotipos foi possível dividi-los em 3 grupos .A estrutura capsular da maioria dos sorotipos é carregada negativamente e composta por polímeros de ácido Teicóico unidos por ligações fosfato diéster, um segundo grupo é composto por polímeros de oligossacarídeo unidos por ligações de fosfato e o terceiro grupo composto por unidades de oligossacarídeos (Perry *et al.*, 1990; Perry *et al.*, 2005; Maclean *et al.*, 2004; Jessing *et al.*, 2008). A composição e a estrutura do CPS determinam a variação de virulência entre as cepas de um mesmo sorotipo ou sorotipo diferente (Dubreuil *et al.*, 2000;. Bandara *et al.*, 2003). Avaliação de isolados geneticamente idênticos sugere que a quantidade e o tipo de CPS produzidos ou o seu mecanismo de expressão determinam a virulência de App em suínos

(Bandara et al., 2003). A cápsula de App tem uma capacidade imunogênica muito limitada (Fenwick and Osburn, 1986; Inzana and Mathison, 1987). Experimentos utilizando cápsulas purificadas, mostraram que a estrutura não ativa a cascata do complemento e não demonstra atividade tóxica (Ward et al, 1994;. Fenwick and Osburn, 1986). Nenhum sintoma clínico ou lesões pulmonares foram encontrados quando a cápsula purificada foi administrada por via endobronquial aos suínos (Fenwick and Osburn, 1986). Embora CPS purificado não provoque a doença clínica ou lesões pulmonares em suínos, a cápsula é essencial para a virulência de App in vivo, uma vez que permite à bactéria resistir ao ambiente antibacteriano produzidos pelo sistema imune do hospedeiro (Dubreuil et al. , 2000).

Lipopolissacarídeos (LPS)

São componentes estruturais essenciais da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Estas estruturas estão envolvidas na adesão do App em células do trato respiratório de suínos e são considerados fatores importantes na patogênese e virulência do microrganismo. Os LPS são formados principalmente por três regiões distintas: o lipídio A, região central, e uma cadeia lateral O - polissacarídeo (Dubreuil et al, 2000). Cada sorotipo tem uma determinada composição e estrutura da cadeia lateral O (Fenwick and Osburn, 1986; Byrd and Kadis, 1989). No entanto, reações imunológicas cruzadas podem ser observadas em alguns sorotipos com a composição similar da cadeia lateral O (Fenwick and Osburn, 1986). As reações cruzadas entre os sorotipos podem ser divididas em grupos sendo eles do sorotipos 1, 9, 11, os sorotipos 3, 6 e 8, e os sorotipos 4 e 7 (Dubreuil et al., 2000). Foram relatadas cepas menos virulentas, caracterizadas por terem um menor teor de LPS por grama de peso seco (Jensen and Bertram, 1986). O LPS purificado não induziu lesões de necrose pulmonar ou hemorragia em suínos. O que indica que eles não sejam capazes de causar as lesões típicas do agente, embora possam contribuir para sua formação (Jansen *et al.*, 1994).

Toxinas (Apx)

Sabe-se que as exotoxinas são proteínas com atividades tóxicas, secretadas durante o processo infeccioso. Essas toxinas são fortemente

imunógenas e possuem atividade hemolítica e/ou citotóxica. Até hoje foram identificados 15 sorotipos de App que secretam diferentes combinações de toxinas pertencentes à família da toxina RTX formadoras de poros (Muñoz, 2003). A família de toxinas formadoras de poros RTX, são amplamente distribuídas entre bactérias patogênicas gram-negativas. Sua toxicidade é dirigida contra os macrófagos alveolares e neutrófilos (Bendixen *et al.*, 1981;. Udeze e Kadish, 1992 e Jansen *et al.*, 1995), e cuja perfuração da membrana, causa um choque osmótico, levando à morte celular (Lalonde et al. 1989, Welch, 1991). Quatro toxinas foram descritas: Apx I, Apx II, Apx III e Apx IV. Essa última é produzida por todos os sorotipos apenas “in vivo” e ainda é pouco estudada. As toxinas Apx são reconhecidas como os principais fatores de virulência do App (Vanden Bergh *et al.*, 2009).

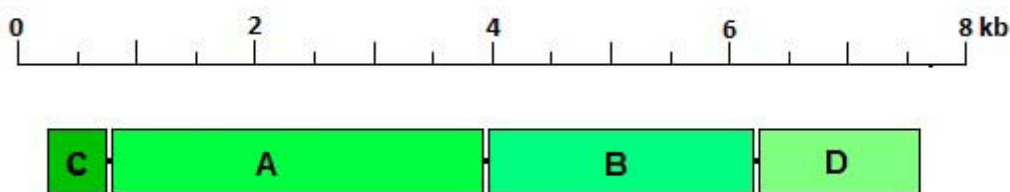
Em geral, as toxinas RTX são codificadas por operons que consistem de quatro genes: C, A, B e D, representados na Figura 1 (Welch, 1991; Tu *et al.*, 1994). Os genes C e A são necessários para a produção estrutural da toxina ativa, onde o gene A é responsável pela codificação da toxina e o gene C responsável pela ativação dessa toxina. Os genes B e D são necessários para a secreção da toxina. A organização do operon *apxI*, que está presente nos sorotipos 1, 5, 9, 10, 11 e 14 apresenta-se completo, *apxI/CABD*. As toxinas ApxI produzidas pelos sorotipos 5a, 5b e 10 apresentam uma pequena diferença devido a uma variação na extremidade 3' deste gene, no entanto a toxina produzida é imunologicamente similar as toxinas ApxI dos outros sorotipos (FREY, 1995). Os genes que codificam a toxina ApxIII, apresentam o mesmo modelo de operon: *apxIII/CABD*. No entanto, o operon *apxII* encontra-se truncado, apresentando somente os genes CA, utilizando para o transporte da toxina os produtos dos genes B e D do operon *apxI*, nos sorotipos 2, 4, 6, 7, 8 e 12. O perfil da produção de toxinas pelos diferentes sorotipos está ilustrada na Tabela 1.

Segundo um estudo realizado por Nagai *et al.*, (1993), a seqüência do gene estrutural que codifica a toxina ApxI do sorotipo 10 é 98% idêntica a do sorotipo 1, a diferença está localizada na extremidade 3'. Ainda segundo o autor, o gene *apxIA* pode ser dividido em 2 grupos: o primeiro grupo seria o da forma original, que inclui os sorotipos 1, 9 e 11, e o segundo grupo uma forma alélica variante que inclui os sorotipos 5a, 5b e 10. Os produtos sintetizados a

partir desse gene apresentam diferenças na estrutura secundária da região proximal da extremidade carboxila.

A regulação da transcrição do operon *apxI* parece ocorrer na presença de ions Ca^{+2} . Gygi *et al.*, (1992), demonstraram que os níveis de mRNA para a toxina ApxI foram aumentando em virtude da multiplicação das células em meio com presença de Ca^{+2} . Segundo Van Leengoed & Dickerson (1992), o cálcio está envolvido na ligação das toxinas com eritrócitos e neutrófilos e também na regulação da toxina ApxI, porém esta hemolisina não necessita da presença de Ca^{+2} como cofator para lise de eritrócitos (Frey & Nicolet, 1988).

Figura 1 – Organização do operon *apxI* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



(Xu *et al.*, 2006)

As toxinas ApxI, ApxII e ApxIII são expressas *in vitro* e *in vivo* e são citotóxicas, em diversos graus contra macrófagos pulmonares, PMN, células epiteliais do pulmão e células endoteliais (Van de Kerkhof *et al.*, 1996). ApxI e ApxII também são hemolíticas. ApxIV é expressa somente *in vivo* e, quando expressa em *Escherichia coli* é fracamente hemolítica (Schaller *et al.*, 1999). ApxI, ApxII e ApxIII contribuem para o desenvolvimento de doença clínica e lesões pulmonares típicas (Inzana, 1991; Tascón *et al.*, 1994; Kamp *et al.*, 1997).

Entre as toxinas Apx, ApxI é secretada pelo sorotipos mais virulentos, ou seja, sorotipos 1, 5, 9, 10 e 11 (Frey, 1995). Apx I é uma proteína de 120 KDa com forte atividade hemolítica (Shin *et al.*, 2003) e citotóxica (Kamp *et al.*, 1991). Sendo considerada, a exotoxina que apresenta maior atividade citotóxica contra macrófagos pulmonares e neutrófilos em suínos. A toxina Apx I perfura a membrana dessas células provocando um choque osmótico que leva a morte celular (Lalonde *et al.*, 1989; Welch, 1991).

Tabela 1 – Perfis da produção de toxinas Apx entre os sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

SOROTIPO	APX I	APX II	APX III	APX IV
1	+	+	-	+
2	-	+	+	+
3	-	+	+	+
4	-	+	+	+
5	+	+	-	+
6	-	+	+	+
7	-	+	-	+
8	-	+	+	+
9	+	+	-	+
10	+	-	-	+
11	+	+	-	+
12	-	+	-	+
13	-	+	-	+
14	+	+	-	+
15	-	+	-	+

+ Presença da produção da toxina; - Ausência da produção da toxina.(Schaller *et al.*, 1999).

2.5 – Caracterização molecular de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Ferramentas moleculares estão sendo aplicadas para análise do genoma inteiro de diversos organismos e estão se tornando cada vez mais importantes para estimar as relações genéticas entre os diferentes biótipos e entre os sorotipos de uma determinada espécie bacteriana (Kokotovic e Øystein, 2007).

Estudos realizados anteriormente utilizando diferentes sorotipos de App mostraram que existem variações significativas entre eles, ao nível de seqüência de DNA. Essa variação implica em diferenças na patogenicidade e imunogenicidade de cada sorotipo (Jacobsen *et al.*, 1996; Maas *et al.*, 2006). No entanto, é difícil realizar estudos dos mecanismos de imunogenicidade dos diferentes sorotipos e até mesmo dentro do mesmo sorotipo, devido à falta de seqüências completas do genoma de todos os diferentes sorotipos (Xie *et al.*, 2010).

Zhan *et al.*, em 2010, utilizaram uma lista de 105 genes de virulência conhecidos e supostos de App presentes na literatura e realizaram um estudo de diversidade destes genes em nível de nucleotídeos, comparando os sorotipos 2 e 6. Sessenta e dois genes de virulência conservados (99% de identidade ou menos de três incompatibilidades) foram encontradas entre esses dois sorotipos, enquanto que 28 genes de virulência mostraram um maior grau de dissimilaridade (identidade de 95% ou mais de 20 incompatibilidades), incluindo o gene *apxIVA* que codifica toxina RTX e gene *cysl* que codifica hemoproteína NADPH-sulfito redutase. Isso demonstra que existem diferenças na virulência entre os sorotipos e que as bases genéticas deveriam ser analisadas em nível de genoma.

Xu *et al.*, em 2010, realizaram um estudo onde efetuaram o seqüenciamento do genoma de nove amostras de referência dos sorotipos 1, 2, 4, 6, 9, 10, 11, 12 e 13 de App e juntamente com as três seqüências genômicas completas de App sorotipos 3, 5b e 7 disponíveis no GenBank, fizeram uma análise genômica comparativa para relatar uma caracterização global do genoma desta bactéria. Sendo observado a presença 54 genes compartilhadas pelos sorotipos de alta virulência 1, 5b, 9 e 11, mas ausente na cepa de baixa virulência do sorotipo 3. Conforme já descrito na literatura, o gene *apxIC*, que codifica a ativação da toxina, e o gene *apxIA* que codifica a proteína estrutural da toxina, estavam presente nas cepas de referência de sorotipos 1, 5b, 9, 10 e 11, que secretam a toxina ApxIA fortemente hemolítica e citotóxicos confirmando os dados publicados por Frey em 1995. Os genes *apxIIIC* e *apxIIIA* envolvidos na expressão da toxina ApxIII, não hemolítica mas fortemente citotóxica, estavam presentes nos isolados de referência dos sorotipos 2, 3, 4 e 6. Levando a conclusão que a composição genética dos genes *apx* em genomas seqüenciados nesse estudo estão de acordo com os padrões do genes *apx* correspondente as amostras dos sorotipos de referência previamente relatados.

3 – OBJETIVO

Isolar e caracterizar o gene *apxIA* de App sorotipo 5 de amostras isoladas no Brasil entre os anos de 2006 a 2010.

3.1 – Objetivos específicos

- Sequenciar o gene *apxIA* de isolados brasileiros de App sorotipo 5.
- Investigar polimorfismos nas seqüências de nucleotídeos do gene *apxIA* de isolados brasileiros de App.
- Comparar as seqüências obtidas e agrupá-las de acordo com a sua homologia.
- Comparar as seqüências obtidas com outras depositadas no NCBI (Genbank), a fim de estudar a história evolutiva do gene *apxIA* em App.
- Investigar a diversidade do gene *apxIA* em diferentes sistemas de criação de suínos.

4 – MATERIAI E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Doenças Bacterianas e de Biologia Molecular de Microorganismos ambos pertencentes ao Setor de Medicina Veterinária preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária, e no laboratório de Bioinformática pertencente ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

4.1 – *Microorganismos condições de cultivo e manutenção*

Para esse estudo foram utilizados 42 isolados de App do sorotipo 5A e 5B, recuperados de casos clínicos de animais doentes pelo laboratório da empresa MICROVET (Microbiologia Veterinária Especial Ltda – Viçosa-MG) que gentilmente cedeu as amostras para essa pesquisa. Os isolados em estudo foram previamente identificados, classificados por testes bioquímicos e sorotipificados na MICROVET.

Isolados de App liofilizados, foram reidratadas utilizando 200 µL de água destilada autoclavada e plaqueadas em agar sangue com 5% de sangue de ovinos e com estria perpendicular de *Staphylococcus aureus*, fornecedora de

NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), incubadas a 37°C por 24 horas. Após a identificação das colônias de App, uma colônia foi passada em Agar chocolate e incubada a 37°C por 24 horas em jarra de microaerofilia para obtenção de massa celular. A massa celular de bactérias obtida foi coletada com auxílio de uma alça e inoculada em um balão contendo 30 ml de meio de infusão de cérebro e coração (BHI). A cultura bacteriana foi cultivada a 37°C, por 24 horas para posterior extração de DNA.

4.2 – Extração de DNA

Uma alíquota de cinco ml do cultivo bacteriano, foi centrifugado a 12.500g, por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi submetido ao protocolo de extração de DNA genômico do kit PureLink™ Genomic DNA Kits da Invitrogen.

4.3 – Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.3.1 –Primers

Foram utilizados três pares de *primers*, um para confirmar, dentre os isolados cedidos, quais eram sorotipo 5 e outros dois para identificar e seqüenciar o gene *apxIA* de App no trabalho. Estes estão descritos no quadro 1.

Quadro 1- Sequência dos *primers* utilizados para confirmação do sorotipo 5 App 5 e para detecção e seqüenciamento do gene *apxIA* – *ApxIA*, pETapxla.

Gene	Primers	Sequência 5` - 3`	Fragmento (pb)
<i>cps</i>	App5 ¹	F - TTT ATC ACT ATC ACC GTC CAC ACC T R - CAT TCG GGT CTT GTG GCT ACT AA	1100
<i>apxIA</i>	ApxIA ²	F - ATC GAA GTA CAT CGC TCG GA R - CGC TAA TGC TAC GAC CGA AC	723
<i>apxIA</i>	pETapxIA ³	F - CAC CAT GGC TAA CTC TCA GC R - TTA AGC AGA TTG TGT TAA ATA ATT AC	3069

¹ - Os primers foram desenhados em um estudo prévio por Lo *et al.*, 1998.

² - Os primers foram desenhados em um estudo prévio por Rayamajhi *et al.*, 2005.

³ - Os primers foram desenhados de acordo com a sequência do gene *apxIA* - AF363361.

4.3.2 – Condições de amplificação

As PCRs foram conduzidas utilizando-se 10 *ng* de DNA extraído por KIT (Ito, 2010), num volume final da reação de 25µL seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen). O material foi amplificado em um termociclador automático modelo PXE0.2 THERMO (Thermo Electron Corporation). O número de ciclos, tempo e as temperaturas utilizadas para cada reação estão descritas a seguir.

O processo de amplificação da PCR utilizando os primers App 5 F/R, para confirmação dos isolados que pertenciam ao sorotipo 5, foi realizado de acordo com as seguintes condições de temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com uma etapa a 95°C por cinco minutos e amplificado por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* a 62°C durante um minuto, polimerização a 72°C por um minuto e trinta segundo. Depois de completados os 30 ciclos, uma etapa final consistia de polimerização a 72°C por três minutos.

Após a confirmação dos isolados de App sorotipo 5 foi realizado uma PCR para amplificação de um fragmento do gene *apxIA*. O processo de amplificação da PCR foi realizado de acordo com as seguintes condições de

temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com uma etapa a 95°C por cinco minutos e amplificado por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 62,5°C durante 30 segundos, polimerização a 72°C por três minutos. Depois de completados os 30 ciclos, uma etapa final consistia de polimerização a 72°C por cinco minutos. Em seguida o DNA dos isolados positivos obtidos nessa PCR foram usados em uma reação de PCR para amplificação total do gene *apxIA*, utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). O processo de amplificação da PCR foi realizado de acordo com as seguintes condições de temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com uma etapa a 95°C por três minutos e amplificado por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento dos *primers* a 52°C durante 40 segundos, polimerização a 72°C por quatro minutos. Depois de completados os 30 ciclos, uma etapa final consistia de polimerização a 72°C por quatro minutos

Como controle positivo foi utilizado o DNA de um isolado de App sorotipo 5A ATCC#33377, previamente extraído pelos pesquisadores do laboratório Microvet. E como controle negativo somente a reação da PCR sem DNA genômico.

4.3.3 – Detecção do produto amplificado

Aproximadamente 20% do volume de cada reação de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% (Ito, 2010), com brometo de etídio numa concentração de 0,5 µg/ml (Taylor, 1993). O gel de agarose foi imerso em uma solução tampão TEB 1X (0,09 M Tris-borato, 0,001 M EDTA, pH 8,3), e foi aplicada uma voltagem de 100 Volts por aproximadamente 40 minutos. Para verificar o resultado das reações de PCR, foi utilizado marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen)

Os fragmentos amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas utilizando a câmera digital Olympus C-5060 wide zoom.

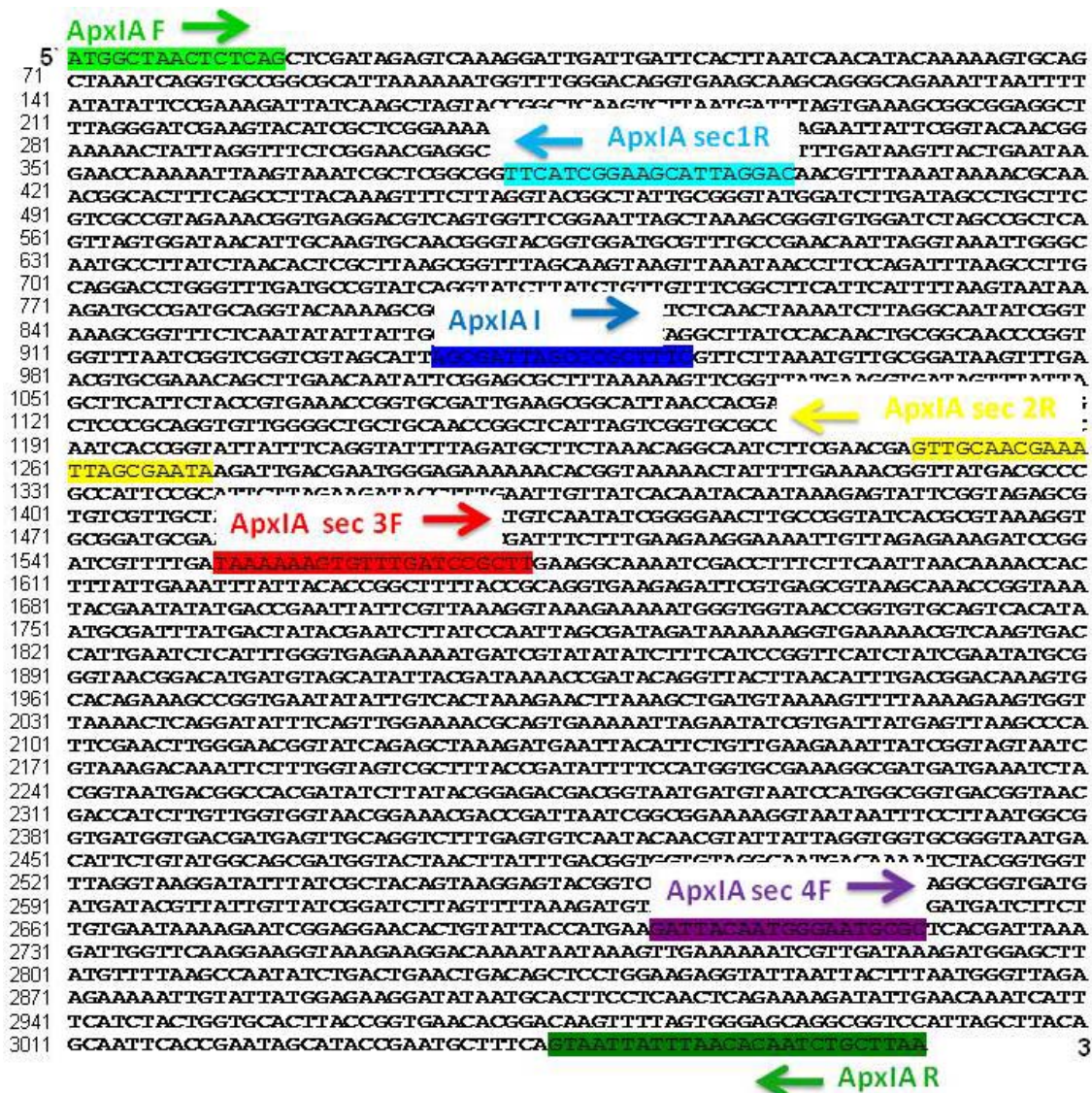
4.4 – Sequenciamento e caracterização dos genes *apxIA*

Os isolados foram seqüenciados na empresa MACROGEN INC⁴ (Coréia do Sul), utilizando a metodologia proposta por Sanger *et al.*,(1982). Com adaptações e utilizando o sequenciador Automatic Sequencer 3730 XL (Applied Biosystems). Os *primers* descritos no quadro 2 e representados na Figura 2 foram utilizados para seqüenciar o gene *apxIA*.

Quadro 2 - Seqüência dos pares de *primers* utilizados para o seqüenciamento dos isolados.

<i>Primers</i>	Sentido	Seqüência 5` - 3`
ApxIA F	Foward	CAC CAT GGC TAA CTC TCA GC
ApxIA R	Reverse	TTA AGC AGA TTG TGT TAA ATA ATT AC
ApxIA I	Foward	AGCGATTAGCCCGCTTTC
Apx Sec 1R	Reverse	GTC CTA ATG CTT CCG ATG AA
Apx Sec 2R	Reverse	TAT TCG CTA ATT TCG TTG CAA C
Apx Sec 3F	Forward	TAA AAA AGT GTT TGA TCC GCT T
Apx Sec 4F	Foward	GAT TAC AAT GGG AAT GCG C

Figura 2 – Representação esquemática dos *primers* utilizados para o seqüenciamento do gene *apxIA* de isolados brasileiros de APP sorotipo 5 e os respectivos sentidos de replicação.



4.4.1 – Sequência de DNA reconstruído a partir de um conjunto de fragmentos de DNA que se sobrepõem

Os fragmentos seqüenciados a partir dos produtos amplificados foram selecionados para montagem dos *contigs*. Os arquivos dos cromatogramas foram analisados utilizando o programa Phred (Ewing e Green, 1998a e Ewing *et al.*, 1998b), que gera um valor de escore (Phred escore - Q) para cada base seqüenciada e avalia a acurácia do seqüenciamento. Nesse programa, foram consideradas apenas as bases que apresentaram valores de Phred escore > 20 (acurácia > 99%), conforme o recomendado por Ewing e Green, 1998a;

Ewing *et al.*, 1998b. Em seguida as sequências foram montadas em *contigs* utilizando o programa Cap3 (Huang *et al.*, 1999).

4.4.2 – Alinhamento das seqüências

Para complementar o conjunto de dados, foram selecionadas quatro sequências do gene *apxA* de App, AF363361, D16582, GQ369732 e CP000569 disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A sequência CP000569 não foi utilizada na comparação de aminoácidos por se tratar de uma sequência parcial.

Os *contigs* correspondentes às sequências dos isolados brasileiros e as selecionadas no GenBank foram alinhadas no programa MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004), utilizando as configurações padrões do aplicativo, e o alinhamento foi manualmente inspecionado.

4.6 – Análise filogenética

Para auxiliar nas análises filogenéticas, o modelo de substituição de nucleotídeos F81+I+G foi estimado a partir do conjunto de sequências alinhadas, utilizando o programa jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008). Esse programa fornece os parâmetros a serem considerados na estimativa das árvores filogenéticas.

A árvore filogenética foi calculada no programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) utilizando o método de *Bayesian Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) em quatro corridas com quatro cadeias e 10.000.000 gerações. A árvore filogenética consenso foi editada usando o programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

4.7 – Obtenção da rede de haplótipos

Para representar as relações genealógicas entre os isolados brasileiros, as sequências foram agrupadas em haplótipos (grupos de sequências com 100% de identidade) utilizando o programa DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009). Em seguida, uma rede de haplótipos foi obtida utilizando o programa Network

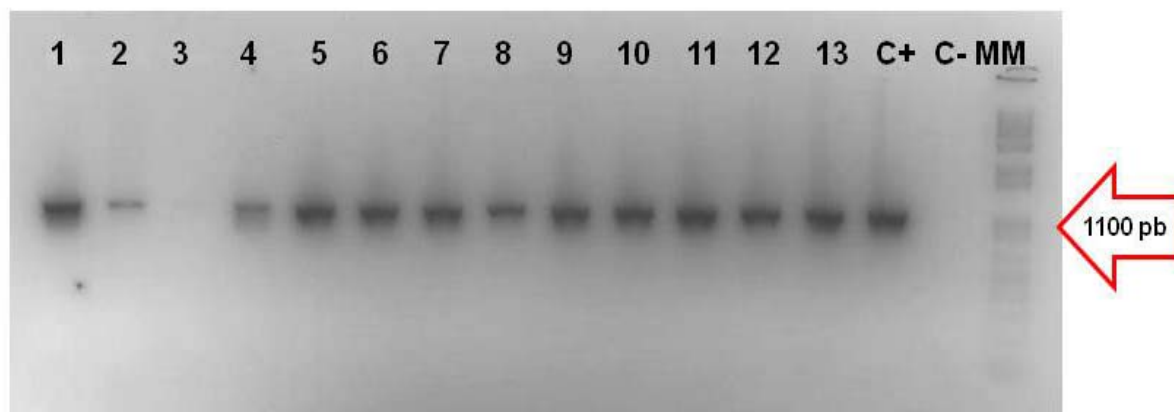
4.6.0.0 (<http://www.fluxus-technology.com>) e calculada utilizando o algoritmo de *Median Joining*-MJ (Bandelt *et al.*,1999).

5 – Resultados

5.1 – Confirmação dos isolados de App Sorotipo 5 pela técnica de PCR

Os *primers* App5F/App5R amplificaram um fragmento de aproximadamente 1100 pb correspondente a uma sequência parcial do gene *cps* sorotipo-específico do sorotipo 5.

A fotodocumentação do gel de agarose do resultado da PCR utilizando os *primers* acima descritos pode ser observada na Figura 3.



C+: controle positivo; **C-:** controle negativo; **MM:** marcador molecular
1 a 13: isolados de campo

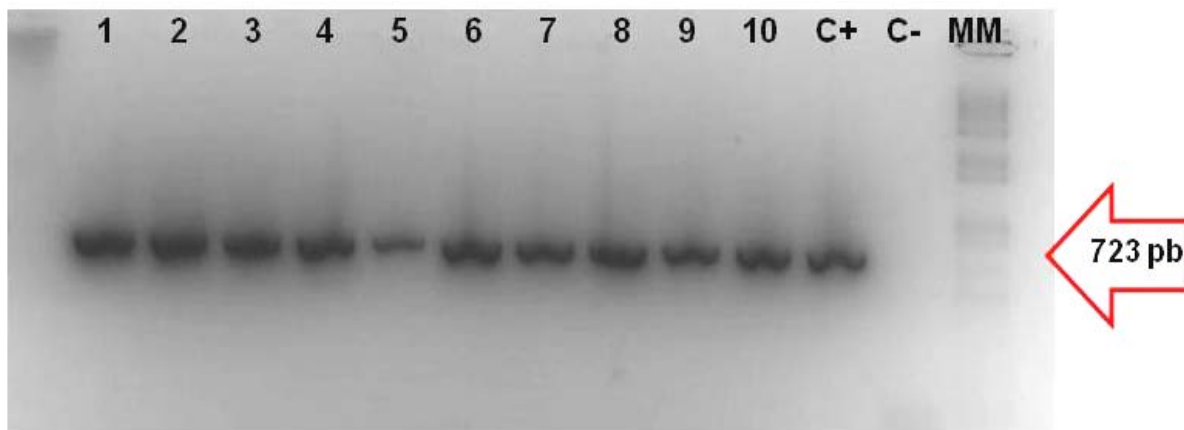
Figura 3 – Confirmação dos isolados de App sorotipo 5 pela identificação do gene *cps* sorotipo específico.

Conforme pode ser visualizado na Figura 3, somente o isolado 3 foi negativo e não amplificou para o sorotipo 5. Por não ter amplificado este isolado não foi utilizado nos estudos subsequentes. Os demais isolados foram considerados positivos.

5.2 – PCR para amplificação do gene *apxIA*.

Após a triagem dos isolados de App sorotipo 5, os *primers* ApxIA F/ ApxIA R foram utilizados para amplificarem um fragmento de 723 pb do gene

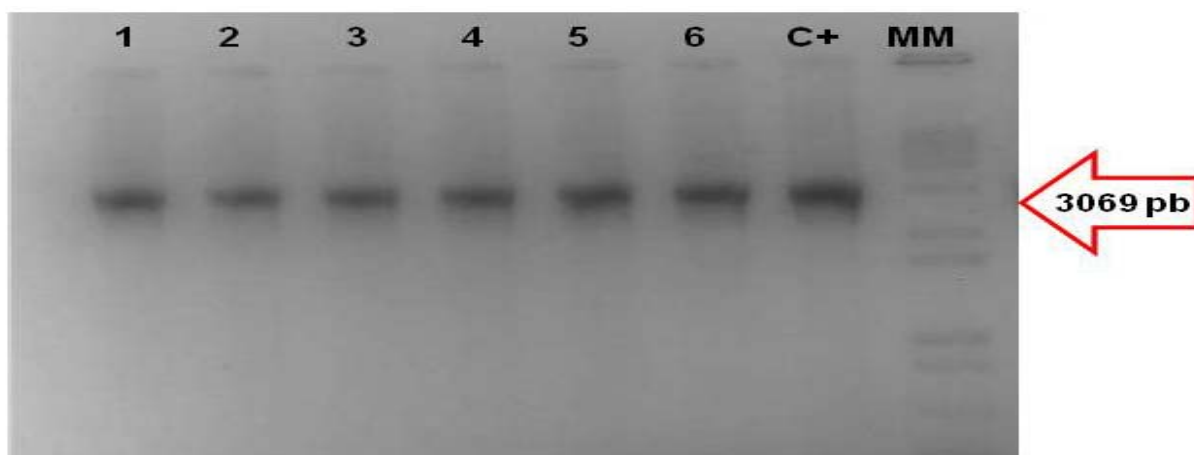
apxIA (Figura 4). Em seguida os *primers* pET *apxIA* F/ pET *apxIA* R, foram utilizados para amplificação completa do gene *apxIA* (3069 pb) (Figura 5). O produto da PCR obtido com a utilização dos últimos *primers* foram enviados para o sequenciamento.



**C+ : controle positivo; C- : controle negativo; MM : marcador molecular
1 a 10: isolados de campo**

Figura 4 – Isolamento do fragmento de 723pb do gene *apxIA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando os primers *ApxIA* F/ *ApxIA* R.

Na Figura 4, todos os isolados amplificaram para fragmento do gene *apxIA*, de 723 pb.



**C+ : controle positivo; MM : marcador molecular
1 a 6: isolados de campo**

Figura 5 – Isolamento do gene *apxIA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando os *primers* pET *apxIA* F/ pET *apxIA* R.

Nessa Figura, todos os isolados amplificaram para o gene *apxlA* completo (3069 pb).

5.3 – Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos

Todas as sequências correspondentes ao gene *apxlA* dos 41 isolados foram obtidas e apresentaram 3069 nucleotídeos seqüenciados o que corresponde ao seqüenciamento do gene *apxlA* completo (Shin *et al.*, 2003).

A Figura 6 mostra a hipótese filogenética obtida a partir da análise das sequências do gene *apxlA* de App (Tabela 2). Esta árvore mostra, basicamente, a existência de dois grupos de sequências. O grupo 1 é composto por 22 sequências brasileiras e as 4 sequências disponíveis no GenBank (NCBI). O grupo 2 é composto de 18 sequências brasileiras. A sequência do isolado brasileiro 791-09 não se enquadrou em nenhum desses dois grupos e foi definida como “sem grupo” (Tabela 2).

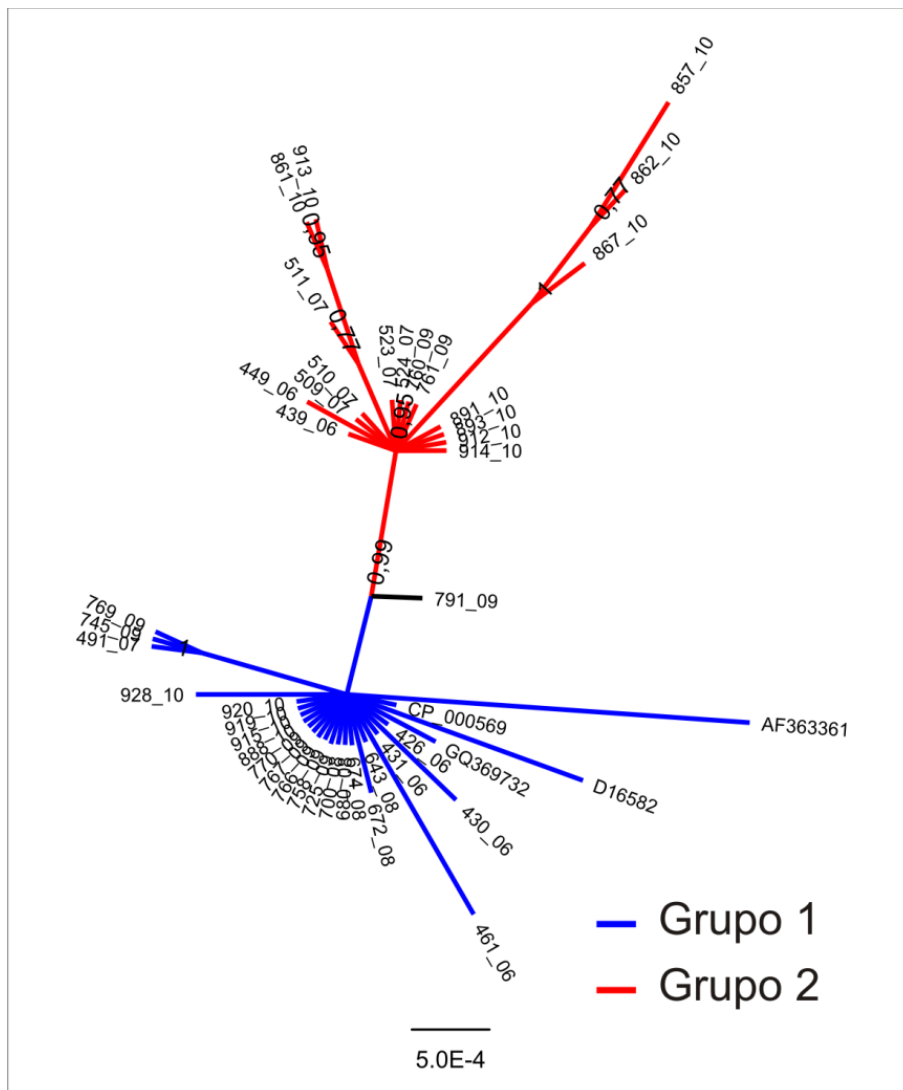


Figura 6 - Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana das 45 sequências do gene *apxIA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Além disso, as sequências brasileiras foram agrupadas em 14 haplótipos, de acordo com os polimorfismos existentes entre as sequências de nucleotídeos, utilizando o programa DnaSP v5. A Tabela 2 apresenta os isolados de App agrupados em cada um desses haplótipos.

Tabela 2 - Classificação das seqüências com suas respectivas freqüências de haplótipos, estados brasileiros e grupo filogenético.

Código do Haplótipo	Freqüência	Isolado	Ano	Estado	Grupo Filogenético
H1	15	426-06	2006	SC	1
H1	15	431-06	2006	SC	1
H1	15	643-08	2008	SC	1
H1	15	674-08	2008	SC	1
H1	15	680-08	2008	SC	1
H1	15	700-08	2008	SC	1
H1	15	725-09	2009	RS	1
H1	15	758-09	2009	SC	1
H1	15	766-09	2009	SC	1
H1	15	767-09	2009	RS	1
H1	15	770-09	2009	SC	1
H1	15	888-10	2010	MG	1
H1	15	915-10	2010	SC	1
H1	15	919-10	2010	SC	1
H1	15	920-10	2010	SC	1
H2	1	430-06	2006	SC	1
H3	11	439-06	2006	SP	2
H3	11	509-07	2007	SC	2
H3	11	510-07	2007	SC	2
H3	11	523-07	2007	SC	2
H3	11	524-07	2007	SC	2
H3	11	760-09	2009	SC	2
H3	11	761-09	2009	SC	2
H3	11	891-10	2010	SC	2
H3	11	893-10	2010	SC	2
H3	11	912-10	2010	SC	2
H3	11	914-10	2010	SC	2
H4	1	449-06	2006	ES	2
H5	1	461-06	2006	SP	1
H6	3	491-07	2007	PR	1
H6	3	745-09	2009	SC	1
H6	3	769-09	2009	SC	1
H7	1	511-07	2007	SC	2
H8	1	672-08	2008	SC	1
H9	1	791-09	2009	MS	Sem Grupo
H10	1	857-10	2010	SC	2
H11	2	861-10	2010	SC	2
H11	2	913-10	2010	SC	2
H12	1	862-10	2010	SC	2
H13	1	867-10	2010	RS	2
H14	1	928-10	2019	SC	1

Como uma forma alternativa de se representar a genealogia dos isolados brasileiros, a rede de haplótipos, Figura 7, permite a representação da frequência na qual cada haplótipo foi encontrado e a sua origem geográfica. Neste trabalho, foram obtidas seqüências de isolados brasileiros originários dos estados: Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul. As análises mostram que o haplótipo H1 é freqüente em três estados: Santa Catarina, Rio grande do Sul e Minas Gerais. Esse haplótipo foi encontrado com a maior freqüência (15/41). O segundo haplótipo mais freqüente foi o haplótipo H3 (11/41), sendo observado nos estados de Santa Catarina e São Paulo. O haplótipo H6 foi encontrado nos estados de Santa Catarina e Paraná, apresentando uma freqüência de 3/41. Em seguida, o haplótipo H11 (2/41) foi observado somente no estado de Santa Catarina. Vários outros haplótipos, provenientes de diferentes estados agruparam apenas um isolado de App (Figura 7).

O haplótipo 5, encontrado em São Paulo apresentou o maior número de diferença de nucleotídeos, quatro, em comparação com o haplótipo H1, sugerindo que as seqüências brasileiras são divergentes entre os estados. O haplótipo H2 apresentou duas mutações na seqüência de nucleotídeos em relação ao haplótipo H1, mostrando que ocorrem variações das seqüências de nucleotídeos dentro de um mesmo estado quando é analisado o estado de Santa Catarina. Também é possível observar duas mutações nos haplótipos H3 e H13 quando comparados com o haplótipo H9. O haplótipo H10 de Santa Catarina quando comparado com o haplótipo H12 também de Santa Catarina apresentou duas mutações. A Figura 7 revela ainda que existem haplótipos (H5, H4 H9 e H13) onde é possível observar claramente a divergência deles em relação a outros haplótipos brasileiros, sendo que estes haplótipos pertencem a diferentes estados brasileiros.

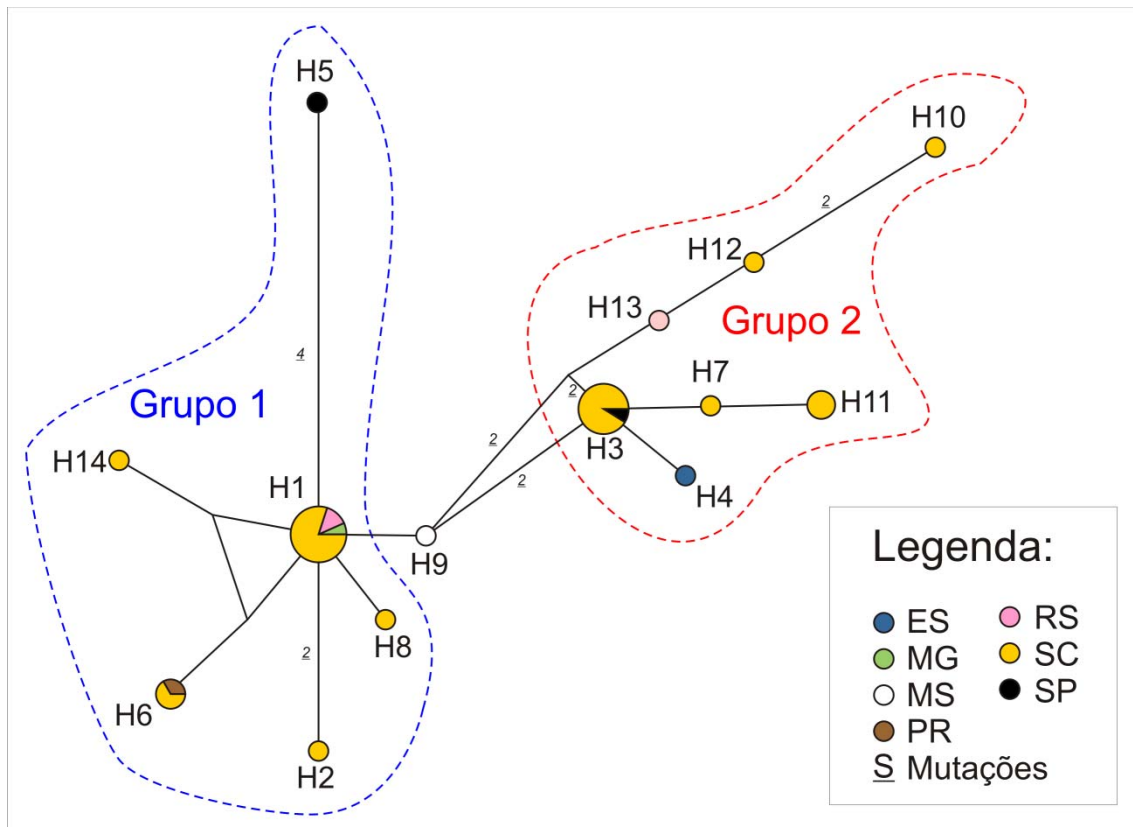


Figura 7 – Rede de haplótipos das sequências brasileiras do gene *apxIA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5 construída pelo aplicativo Network 4.6.0.0. O tamanho das circunferências é proporcional às frequências relativas dos haplótipos.

Seguindo na análise dos haplótipos, podemos observar que dentro de algumas propriedades ocorre diversidade de haplótipos, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação das sequências de acordo com o ano de isolamento, propriedade, sistema de criação de suínos, estados, haplótipos e grupos filogenético.

Isolado	Ano	Propriedade	Sistema de criação	Estado	Haplótipo	Grupo Filogenético
867-10	2010	A	Independente	RS	H13	2
426-06	2006	B	Independente	SC	H1	1
431-06	2006	C	Independente	SC	H1	1
430-10	2006	C	Independente	SC	H2	1
439-10	2006	D	Independente	SP	H3	2
461-07	2007	D	Independente	SP	H5	1
725-09	2009	E	Independente	RS	H1	1
767-09	2009	F	Independente	RS	H1	1
523-07	2007	G	Independente	SC	H3	2
888-10	2010	H	Independente	MG	H1	1
449-06	2006	I	Independente	ES	H4	2
491-07	2007	J	Independente	PR	H6	1
510-07	2007	K	Independente	SC	H3	2
511-07	2007	K	Independente	SC	H7	2
509-07	2007	L	Independente	SC	H3	2
524-07	2007	M	Independente	SC	H3	2
770-09	2009	N	Independente	SC	H1	1
769-09	2009	N	Independente	SC	H6	1
791-09	2009	O	Independente	MS	H9	Sem Grupo
861-10	2010	P	Independente	SC	H11	2
643-08	2008	Q	Integração	SC	H1	1
674-08	2008	Q	Integração	SC	H1	1
680-08	2008	Q	Integração	SC	H1	1
700-08	2008	Q	Integração	SC	H1	1
672-08	2008	Q	Integração	SC	H8	1
766-09	2009	Q	Integração	SC	H1	1
758-09	2009	Q	Integração	SC	H1	1
745-09	2009	Q	Integração	SC	H6	1
761-09	2009	Q	Integração	SC	H3	2
760-09	2009	Q	Integração	SC	H3	2
915-10	2010	Q	Integração	SC	H1	1
919-10	2010	Q	Integração	SC	H1	1
920-10	2010	Q	Integração	SC	H1	1
891-10	2010	Q	Integração	SC	H3	2
893-10	2010	Q	Integração	SC	H3	2
912-10	2010	Q	Integração	SC	H3	2
914-10	2010	Q	Integração	SC	H3	2
857-10	2010	Q	Integração	SC	H10	2
913-10	2010	Q	Integração	SC	H11	2
862-10	2010	Q	Integração	SC	H12	2

928-10	2010	Q	Integração	SC	H14	1
--------	------	---	------------	----	-----	---

De acordo com a Tabela 3, a diversidade de haplótipos em uma mesma propriedade é observada não somente no sistema de integrações, mas também na criação de suínos independentes.

Na propriedade C, do estado de Santa Catarina foram encontrados dois haplótipos diferentes, H1 e H2, sendo que ambos foram isolados no ano de 2006 e pertencem ao grupo filogenético 1. Na propriedade D, do estado de São Paulo, foram encontrados os haplótipos H3 e H5 sendo que o H3 foi isolado no ano de 2006 e pertence ao grupo filogenético 1 e o H5 isolado no ano de 2007 pertencendo ao grupo 2. A propriedade K do estado de Santa Catarina apresentou diversidade de haplótipos sendo encontrado no ano de 2007 os haplótipos H3 e H7 ambos pertencente ao grupo 2. A propriedade N, também de Santa Catarina, apresentou em 2009 dois haplótipos em sua propriedade, H1 e H6, ambos do grupo 1.

A análise de um único sistema de integração, propriedade Q, no estado de Santa Catarina, dos 21 isolados analisadas, observaram-se oito haplótipos diferentes sendo que nove isolados pertenciam ao haplótipo H1, seis isolados ao haplótipo H3, e para os demais haplótipos (H6, H8, H10, H11, H12, H14) apenas um isolado para cada haplótipo respectivamente. No ano de 2008 foram encontrados os haplótipos H1 e H8, ambos pertencentes ao grupo 1. Enquanto no ano de 2009 foram encontrados três haplótipos diferentes, H1 e H6 pertencentes ao grupo filogenético 1 e H3 pertencente grupo filogenético 2. No ano de 2010 houve a maior diversidade de haplótipos, sendo encontrados seis diferentes. Os haplótipos H1 e H14 pertencentes ao grupo filogenético 1 e os haplótipos H3, H10, H11 e H12 pertencentes ao grupo 2.

As diferenças entre os aminoácidos das sequências brasileiras estudadas e agrupadas em 14 haplótipos acrescida das 3 sequências encontradas no GenBank estão representadas na Figura 8.

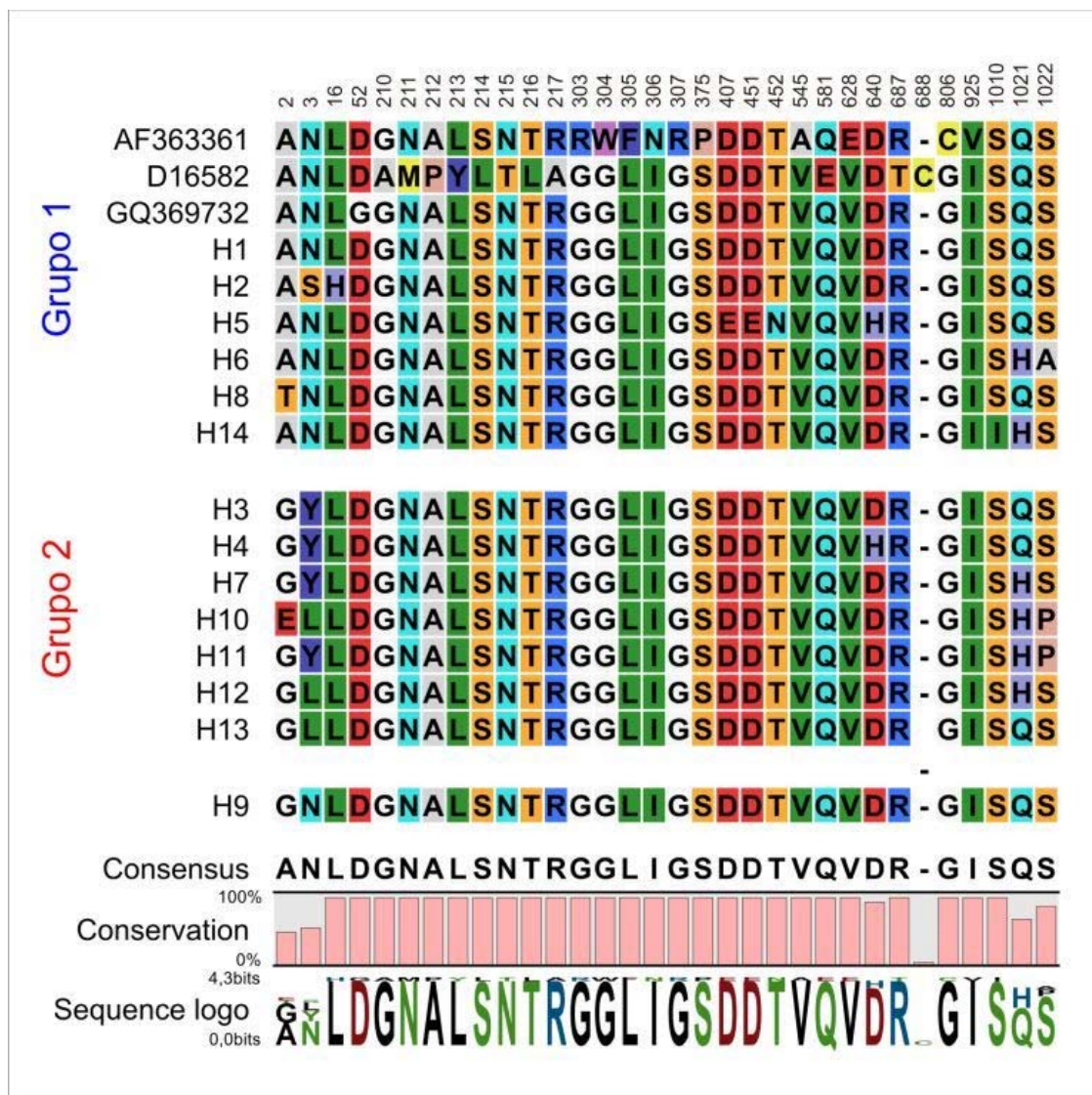


Figura 8 – Localização de polimorfismos de aminoácidos da toxina Apxl entre os isolados brasileiros de App e as sequências disponíveis no GenBank (NCBI), agrupados de acordo com os haplótipos e o grupo filogenético.

De acordo com a classificação filogenética onde se agrupou as sequências em grupos 1 e 2 (Figura 6 e Tabela 2), observa-se que essa separação foi devido principalmente aos polimorfismos nos resíduos de aminoácidos 2 e 3 da proteína Apxl. No caso do grupo 1 a maioria das sequências apresentam no sítio 2 o aminoácido alanina (A) e apenas a sequência H8 apresenta um aminoácido diferente, treonina (T). No grupo 2, o aminoácido glicina (G) é o mais freqüente no sítio 2 e apenas o haplótipo H10 apresenta o aminoácido ácido glutâmico (E) (Figura 8).

Ao comparar o sítio 3 da proteína, o grupo 1 é constituído em sua maioria por asparagina (N), sendo que o H2 se diferencia por apresentar o aminoácido serina (S). Enquanto no grupo 2, grande parte é composta pelo aminoácido tirosina (Y), e outra parte composta por leucina (L).

O haplótipo H9, não entrou na classificação filogenética proposta, pois apresenta no sítio 2 da proteína uma glicina (G), igual ao encontrado no grupo 2, e no sítio 3 uma asparagina (N) igual ao encontrado no grupo 1.

6 – Discussão

De acordo com Xie *et al.*, em 2010, realizar estudos visando a análise de mecanismos de imunogenicidade nos diferentes sorotipos e até mesmo dentro do mesmo sorotipo é difícil devido a falta de seqüências completas de genomas de App dos diferentes sorotipos. Até hoje, todos os trabalhos envolvendo o estudo da toxina Apx I são em nível de expressão da toxina e como candidato vacinal (Shin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2009), de estudo da imunogenicidade e patogenicidade (Bagdasarian *et al.*, 1999 e Boekema *et al.*, 2004). Nenhum estudo relacionado com o genoma de App (Nagai *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010 e Zhan *et al.*, 2010) direcionou-se para o foco filogenético utilizando o gene *apxA*, um dos motivos pode ser devido a indisponibilidade de seqüências desse gene no banco de dados GenBank.

Devido à importância da toxina ApxI que apresenta um grande poder de citotoxicidade e atividade hemolítica, produzida pelos sorotipos mais virulentos 1, 5, 9, 10 e 11, além do sorotipo 14 e pelo fato do sorotipo 5 ter sido encontrado com maior freqüência no Brasil (Kuchiishi *et al.*, 2007), esse estudo foi conduzido no intuito de seqüenciar e comparar as seqüências do gene *apxA* de App sorotipo 5 isolados de casos clínicos. Com base nessas informações, foram construídos *primers* para confirmação de um fragmento do gene *cps* do sorotipo 5 conforme descrito por Ito, 2010. Essa PCR permitiu confirmar com fundamentos moleculares quais isolados realmente eram App sorotipo 5 (Figura 3). Os isolados positivos nessa PCR foram submetidos a outra PCR para amplificação do gene *apxA*. A utilização de mais dois pares de *primers* para identificar o gene *apxA* foi realizada no intuito de se ter uma melhor

triagem dos isolados analisados o que garantiria o sucesso do experimento (Figura 4 e 5). Todos os 41 isolados testados tiveram o gene completamente amplificado e seqüenciado, concluindo assim, o primeiro objetivo: sequenciar o gene *apxIA* de isolados brasileiros.

No que diz respeito à diversidade genética do gene *apxIA* do Brasil, a análise dos 41 isolados do gene *apxIA* revelou a presença de polimorfismos entre as seqüências de nucleotídeos. A partir desses polimorfismos foi possível agrupar as seqüências brasileiras em 14 haplótipos e também determinar a freqüência em que esses haplótipos foram encontrados (Figura 7 e Tabela 2). O maior número de isolados oriundos de Santa Catarina pode ser explicado por esse estado ser o maior produtor de suínos do país com 386.000 matrizes alojadas, com uma produção de 8.685 mil animais e gerando 746,9 mil toneladas de carne só no ano de 2010 (Abipecs, 2010). Entretanto, dentro desse mesmo estado observa-se que há diversidade genética entre os isolados. O haplótipo H2 está separado do haplótipo H1 por duas mutações, e o haplótipo H10 diverge do haplótipo H12 também em duas mutações (Figura 7). Em relação ao haplótipo H1, o haplótipo H5 foi o que apresentou maior substituições de nucleotídeos, separado por quatro mutações em sua seqüência. Esse evento pode ser explicado pela origem do haplótipo, pois o isolado H5 foi encontrado no estado de São Paulo, local onde a bactéria em estudo está sob pressão de seleção diferente das condições encontradas nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais os quais constituem o haplótipo H1.

De acordo com a Figura 7 pode-se sugerir que uma possível origem dessa diversidade de haplótipos pode ser o estado de Santa Catarina, por receber material genético de diversas origens e por manter o maior plantel de animais no país por muitos anos (Abipecs, 2010). A pressão de seleção por uso de antimicrobianos, utilização de diferentes materiais genéticos e instalações com diferentes graus de biosseguridade é maior do que em outros estados, podendo, ser considerado um centro disseminador dessa bactéria.

A grande diversidade de haplótipos encontrada no sistema de criação tipo integração, oito haplótipos diferentes, demonstra que dentro de um sistema de criação moderno e consolidado, existem cepas diferentes circulando entre a população de suínos. Dentro desse contexto, a pressão de seleção sobre os

patógenos aumenta e seleciona os isolados mais resistentes. Para um controle efetivo maior, o uso de vacinas capazes de acompanhar essa diversidade genética parece ser a forma mais adequada e eficiente de controle. O mesmo controle proposto para o sistema de integração pode ser utilizado para o controle nas propriedades de criadores independentes. A diversidade de haplótipos encontradas no sistema de integração no ano de 2010 foi maior que nos anos anteriores, podendo ter sido influenciada pela maior amostragem de isolados estudados nesse ano em relação aos anos anteriores.

A classificação filogenética dos isolados brasileiros, comparando as sequências obtidas com as presentes no GenBank e agrupando-as de acordo com sua homologia, permitiu definir uma árvore filogenética das 41 sequências brasileira e das quatro sequências disponíveis no GenBank em dois grupos principais (Figura 6). No entanto essa classificação difere da classificação proposta por Nagai *et al.*, (1993) em que os grupos eram divididos de acordo com similaridade da sequência do gene *apxIA* de cada sorotipo. Sendo o grupo original composto pelos sorotipos 1, 9 e 11 e o grupo que apresentava uma forma alélica variante composta pelos sorotipos 5A, 5B e 10. Das 41 sequências brasileiras, 22 foram agrupadas juntamente com as amostras do GenBank no grupo 1 e 18 sequências brasileiras foram agrupadas no grupo 2, enquanto o isolado 791-10 não foi incluído em nenhum grupo. A separação das sequências em dois grupos permite concluir que existem diferenças na toxina Apxl produzida na população de App circulantes no Brasil, indicando assim que estudos de possíveis candidatos vacinais que utilizassem essa toxina deveriam levar em conta essa diversidade. A separação entre grupo 1 e 2 observada na árvore filogenética (Figura 6) se deve a polimorfismos de nucleotídeos que também promovem alterações nos aminoácidos da proteína. Trinta e duas alterações foram encontradas entre as 45 sequências analisadas. A diferença entre os grupo 1 e 2 está principalmente nos sítios 2 e 3 da proteína conforme pode ser observado na Figura 8. Caso não se leve em consideração as sequências AF363361 e D16582, essa diferença seria menor. A sequência GQ369732 é a única das sequências encontradas no GenBank que se assemelha as encontradas no Brasil. O isolado do haplótipo H9 (791-10) não foi agrupado em nenhum dos dois grupos por apresentar características comuns a ambos. No sítio 2 ele apresenta uma glicina (G) encontrada também

no grupo 2 e no sitio 3, ele apresenta uma asparagina (N) encontrada no grupo 1. Para agrupá-lo em um novo grupo filogenético seria necessário a obtenção de mais isolados apresentando sequências com essas características. Esse isolado é originário do Mato Grosso do Sul, estado que cresceu 24,98% no alojamento de matrizes no período de 2009/2010, sendo o maior crescimento observado entre os estados produtores de suínos (Abipecs, 2010). Por ser um estado onde houve um grande desenvolvimento na produção de suínos nos últimos anos, os desafios e pressões de seleção sob os patógenos são diferentes das encontradas nos outros estados que já apresentavam uma produção de suínos ao longo dos anos.

A comparação das sequências brasileiras com as depositadas no GenBank a fim de se estudar a história evolutiva do gene, não permitiu qualquer relação linear entre tempo evolutivo e grau de divergência genética conforme pode ser observado na Figura 6.

O gene *apxIA* mostrou ser muito conservado, porém a presença de polimorfismos entre as sequências evidencia a existência de cepas diferentes circulantes, todas elas causando graves surtos de pleuropneumonia suína. Algumas explicações para essas diferenças entre os isolados estudados podem ser o uso indiscriminado de antimicrobianos por parte dos produtores, selecionando os microorganismos mais resistentes, a utilização de diferentes genéticas dos reprodutores, ou um mecanismo de escape imunológico do patógeno frente às defesas do organismo.

Devido a essas alterações encontradas e o desenvolvimento de sistemas de produção cada vez mais intensivos, tem-se observado o surgimento de cepas resistentes devido uso indiscriminado de antimicrobianos no controle das doenças, conseqüentemente o aumento dos custos de produção. Dessa forma, a utilização de programas preventivos com a utilização de vacinas rebanho-específica desenvolvidas a partir de agentes isolados de casos clínicos de campo, parece ser a melhor alternativa.

Este foi o primeiro relato de estudo filogenético do gene *apxIA* realizado no Brasil, o que proporcionou a identificação da diversidade genética do App de isolados brasileiros de diferentes estados. Esse estudo contribuirá para futuras pesquisas de candidatos vacinais e também no estudo epidemiológico da diversidade do agente.

7 – Conclusões

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- ✓ Foi realizado pela primeira vez o seqüenciamento do gene *apxIA* completo de isolados de App no Brasil.
- ✓ A análise filogenética permitiu agrupar os isolados em dois grandes grupos, que se diferenciam pela presença de polimorfismos principalmente nos resíduos de aminoácidos 2 e 3 da proteína ApxI.
- ✓ A comparação de sequências do gene *apxIA* permitiu agrupar os isolados brasileiros em 14 haplótipos.
- ✓ As sequências dos isolados brasileiros de App apresentaram diversidade genética em relação às disponíveis no GenBank.
- ✓ Não foi observada uma relação entre os anos de amostragem e a diversidade genética dos isolados brasileiros.
- ✓ Nos sistemas de criação independente e integração houve diversidade de haplótipos na mesma propriedade e no mesmo ano.

8 – Perspectivas futuras

- ✓ As sequências geradas serão depositadas em bancos de dados públicos (GenBank), permitindo a realização de novos estudos com o gene *apxA*.
- ✓ Utilização dessa ferramenta na formulação de vacinas mais específicas para cada propriedade, principalmente no sistema de integrações.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECSa. Estatísticas do consumo, exportação, importação e produção mundial da carne suína. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em 12 de Abril de 2011.

ABIPECS. Relatório anual da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, do ano de 2010. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em 12 de abril de 2011.

ABIPECS. Relatório da produção brasileira de carne suína de 2004 a 2010. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em 18 de março de 2011.

BAGDASARIAN, M.M.; NAGAI, M.; FREY,J.; BAGDASARIAN, M., Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. **Vaccine**.17 (5): 441-447, 1999.

BANDARA, A.B.; LAWRENCE, M.L.; VEIT, H.P.; INZANA, T.J., Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. **Infection and Immunity**. 71: 3320–3328, 2003.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A., Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**.16, 37–48, 1999.

BECK, M.; VAN DEN BOSCH, J. F.; JONGENELEN, I. M.; LOEFFEN, P. L.; NIELSEN, R.; NICOLET, J.; FREY,J., RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. **Journal of Clinical Microbiology**. 32: 2749–2754, 1994.

BENDIXEN,P.F.; SHEWEN, P.E.; ROSENDAL,S & WILKIE, B.N., Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for Porcine Lung Macrophages, Peripheral blood Monocytes and Testicular Cells. **Infection and Immunity**. 33: 673-676, 1981.

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

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

BOEKEMA, B.K.H.L., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., SMITH, H.E., KAMP, E.M., VANPUTTEN, J.P., VERHEIJDEN, J.H., Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells, **Veterinary Microbiology**. 93:133–144, 2003.

BOEKEMA, B.K.H.L.; KAMP, E.M.; SMITS, M.A.; SMITH, H.E.; STOCKHOFE-ZURWEIDEN, N., Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. **Veterinary Microbiology**. 100:17-23, 2004.

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

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

BYRD, W. and KADIS, S., Structures and sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. **Infection and Immunity**. 57: 3901- 3906, 1989.

BUETTNER, F.F.R., MAAS, A., GERLACH, G.F., An *Actinobacillus pleuropneumoniae arcA* deletion mutant is attenuated and deficient in biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. 127:106- 115, 2008.

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

CHIANG, C.H.; HUANG, W.F.; HUANG, L.P.; LIN, S.F.; YANG, W.J., Immunogenicity and protective efficacy of ApxIA and ApxIIA DNA vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* lethal challenge in murine model. **Vaccine**.27(34):4565-4570, 2009.

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**, 85: 343-352, 2002.

CHIERS,K.; WAELE, T.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK,F., Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**. 41: 5, 65, 2010.

CHRISTENSEN, G.; SORENSEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, S.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELNG, W.L.; TAYLOR, D.J., **Diseases of swine**. 8 ed. Ames: Iowa State University Press, 913-940, 1999.

DESROSIERS, R., Therapeutic Control and Economic Aspect of Porcine Pleuropneumonia in Finishing Units. **Veterinary Research**. 119: 89-90, 1986

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

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

DUBREUIL, J.D.; JACQUES, M.; MITTAL, K.R.; GOTTSCHALK, M., *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. **Animal Health Research Reviews** 2:73-93, 2000.

EDGAR, R.C., MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 32, 1792–1797, 2004.

EWING, B. GREEN, P., Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** 8:186-194, 1998a.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDEL, M.; GREEN, P., Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** 8:175-185,1998b.

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

FENWICK, B.W. and OSBURN, B.I., Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. **Infection and Immunity** 54:575-582, 1986.

FREY, J., Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends of Microbiology**. 3, 257-261, 1995.

FREY, J. & NICOLET, J., Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca²⁺. **Infection and Immunity**, 56: 2570-2575, 1988.

FULLER, T. E.; MARTIN, S.; TEEL, J. F., ALANIZ, G. R., KENNEDY, M. J. and LOWERY, D. E., Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. **Microbiology Pathogens**. 29, 39-51, 2000.

GOTTSCHALK, M., *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence. **American Association of Swine Veterinarians** 381-384, 2007.

GYGI, D.; NICOLET, J.; HUGHES, C.; FREY, J., Functional analysis of the Ca²⁺ regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Infection and Immunity**. 60:3059-3064, 1992

HOELTIG, D.; HENNIG-PAUKA, I.; THIES, K.; REHM, T.; BEYERBACH, M.; STRUTZBERG-MINDER, K.; GERLACH, G.F.; WALDMANN, K.H.; IRAS, F.C., A novel clinical scoring system reveals the role of innate immunity and breed in resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **BMC Veterinary Research**, 5:14, 2009.

HUANG, X. and MADAN, A., CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**., 9, 868-877, 1999.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F., Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen, R. (Ed.), **Statistical Methods in Molecular Evolution**. Springer, New York, 2005.

INZANA, T.J. and MATHISON, B., Type-specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**. 55:1580-1587, 1987

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

IZANO, E.A., SADOVSKAYA, I., VINOGRADOV, E., MULKS, M.H., VELLIYAGOUNDER, K., RAGUNATH, C., Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, **Microbial Pathogenesis**. 43:1–9, 2007.

ITO, H., Development of a *cps*-Based Multiplex PCR for Typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 1, 2 and 5. **Journal of Veterinary Medical Science**, 72(5): 653–655, 2010.

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

JANSEN, R.; BRIAIRE, J.; VAN GEEL, A.B.M.; KAMP, E.M.; GIELKENS, A. L. J.; SMITS, M.A., Genetic Map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-Toxin (Apx) Operons: Characterization of the ApxIII Operons. **Infection and Immunity** 62:(10) 4411-4418,1994.

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

JENSEN, A.E. and BERTRAM, T.A. ,Morphological and biochemical comparison of Virulent and Avirulent Isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* Serotype 5. **Infection and Immunity**. 51:419-424, 1986.

JESSING, S.G.; AHRENS, P.; INZANA, T.J.; ANGEN, O., The genetic organisation of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7, and 12. **Veterinary Microbiology**, 22:350-359, 2008.

KAPLAN, J.B., VELLIYAGOUNDER, K., RAGUNATH, C., ROHDE, H., MACK, D., KNOBLOCH, J.K.M., RAMASUBBU, N., Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms, **Journal of Bacteriology**.186:8213–8220, 2004.

KAPLAN, J.B., MULK, M.H., Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**. 108:89–94, 2005.

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**,59, 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**, 65, 4350-4354,1997.

KICH, J.D.; MORES, N., Complexo de doenças respiratórias dos suínos: etiologia e ocorrência. In: I Simpósio Brasil Sul de Suinocultura, Chapecó, 2008. **Anais do Simpósio Brasil Sul de Suinocultura**, Chapecó, Brasil, 31-34, 2008.

KOKOTOVIC, B.; and ØYSTEIN, A., Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. 45:3921-3929, 2007.

KUCHIISHI, S.S.; KICH, J.D.; RAMENZONI, M.L.F.; SPRICIGO, D.; KLEIN, C.S.; FAVERO, M.B.B.; PIFFER, I.A., Sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados no Brasil de 1993 a 2006. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, p.79-82, 2007.

LABRIE, J., PELLETIER-JACQUES, G., DESLANDES, V., RAMJEET, M., AUGER, E., NASH, J.H.E., JACQUES, M., Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, **Veterinary Research**. 41(1) 3, 2010

LALONDE, G.; MCDONALD, T.V.; GARDNER, P. & O'HANLEY, P.O., Identification of a Hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Characterization of its Channel Properties in Planar Phospholipids Baitlayers. **Journal of Biological Chemistry**. 264 : (23) 13559-13564, 1989

LIBRADO, P. & ROZAS, J., DNASP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25, 1451–1452, 2009.

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.

MAAS, A.; MEENS J.; BALTES, N.; HENNIG-PAUKA, I.; GERLACH, G.F., Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Vaccine**, 24:7226–7237, 2006.

MACLEAN, L.L.; PERRY, M.B.; VINOGRADOC, E., Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13. **Infection and Immunity**. 72: 5925–5930, 2004.

MAES, D.; CHIERS, K.; HAESEBRUCK, F.; LAEVENS, H.; VERDONCK, M. & DE KRUIF, A., Herd Factors Associated with the Seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovars 2, 3 and 9 in Slaughter Pigs from Farrow-to-finish Pig Herds. **Veterinary Research**. 32:(5) 409-419, 2001.

MØLLER, K. & KILLIAN, M. V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. **Journal of Clinical Microbiology**, 28:(12), 2711-2716, 1990.

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**, 36(6), 679-693, 1984.

MORENO, A.M.; BARBARINI JUNIOR, O.; BACCARO, M.R., Levantamento sorológico para *Actinobacillus pleuropneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte, MG. **Anais do Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Belo horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 384p. 159-160, 1999.

MUÑOZ, A.M., **Expresión Recombinante em *E. coli* de antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para vacinação y diagnóstico.** Universitat Autònoma de Barcelona – Espanha. Tese Doutorado 129p, 2003

NAGAI, S.; YAGIHASHI, T.; ISHIHAMA, A., DNA sequence analysis of an allelic variant of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX- toxin I (ApxIA) from serotype 10. **Microbial Pathogenesis**, 15(6), 485-495, 1993.

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

NICOLET, J., Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, p.578-580, 1988.

NIELSEN, R.; THOMSEN A. D.; DUEDAHL VESTERLUNG, S., Pleuropneumonia caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. An attempt to control disease at two progeny testing station by serological blood testing followed by removal of the seropositive animals and their litter mates. **Nordisk Veterinaer Medicin**, 28, 349-352, 1976.

NIELSEN, R., *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes. Cross protection experiments. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v.36, p.221-234, 1984.

PERRY, M.B.; ALTMAN, E.; BRISSON, J.R.; BEYNON, L.M., Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide involved in serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease**,4:299-308, 1990.

PERRY, M.B.; MACLEAN, L.L.; VINOGRADOV, E., Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. **Biochemistry and Cell Biology**. 83: 61–69, 2005.

PIFFER, I.A. *et al.*, Efeito das afecções pulmonares, observadas no abate, sobre o desenvolvimento dos suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2., 1985, Rio de Janeiro, RJ. **Anais do Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 105-106, 1985.

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**, 49(1), 123-129, 1997.

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

POSADA, D., jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256, 2008.

PORKWORD. Disponível em: <http://www.porkword.com.br>. Acesso em 20 de Abril de 2009.

PROTAS, J.F.S. *et al.*, Custo de um surto de pleuropneumonia suína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 20(2), 241- 244, 1985.

RAYAMAJHI, N., SHIN, S. J.; KANG, S. G.; LEE, D. Y.; AHN, J. M.; YOO, H. S., Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 17:359–362, 2005.

RODRÍGUEZ-FERRI, E.F., Caracterización y Prevalencia de Cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em España. **Revista Anaporc**, 219: 5-51, 2002.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P., MRBAYES: 3 Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19, 1572–1574, 2003.

ROSENDAL, S. & BOYD, D.A., *Haemophilus pleuropneumoniae* Serotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. 16:(5) 840-843, 1982.

SANGER, F.; COULSON, A.R.; HONG, G.F.; HILL, D.F.; PETERSEN, G.B., Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. **Journal of Molecular Biology**, 162: 729-773, 1982.

SANTOS, J.L.; BARCELLOS,D.; MORÉS,N., *Pleuropneumonia*. In: Sobestiansky,J.;Barcellos, D. **Doença de Suínos**.,Goiânia: Cãnone Editorial, 182-186, 2007.

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**, 73, 337-347, 2000.

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*. **Microbiology**, 145 (8), 2105-2116, 1999.

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

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.

SILVA, A.F. *et al.*, Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I- Estudo do perfil de doenças respiratórias nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2001, Porto Alegre, RS. **Anais do Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**. Porto Alegre : Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. 384p, 31-32, 2001.

SJOLUND,M.; WALLGREN, P., Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v 52: 23, 2010.

SHIN, S.J.; BAE,J.L.; CHO,Y.W.; YANG, M.S.; KIM, D.H., JANG, Y.S.; YOO, H.S., Expression of *apxIA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Veterinary Science**, 4(3), 225-228, 2003.

SHIN, S.J.; SHIN, S.W.; KANG, M.L.; LEE, D.Y.; YANG, M.S.; JANG, Y.S.; *et al.*, Enhancement of protective immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* *ApxIA* or *ApxIIA* in mice. **Journal of Veterinary Science**,;8(4):383–392, 2007.

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

TASCÓN, R.I., VASQUEZ-BOLAND, J.A., GUTIERREZ-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**, 14, 207-216, 1994.

TAYLOR, G.R., Polymerase Chain Reaction: basic principles and automation. In: McPHERSON, M. J.; QUIRKE, P.; TAYLOR G. R. (Eds.). **PCR: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 15–16, 1993.

TAYLOR, D.J., *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw, B.E., D’Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., (Eds.). **Diseases of Swine 9th ed.**, Ames : Blackwell Publishing Professional, 563-576, 2006.

TORREMORELL, M.; PIJOAN, C.; JANNI, K.; WALKER, R. & JOO, H.S., Airbone Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Nursery Pigs. **American Journal Veterinary Research**. 58(8): 828-832, 1997.

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**, 62:2119-2121, 1994.

UDEZE, F.A. & KADISH, S., Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin on Porcine Neutrophil Function. **Infection and Immunity**, 60:(4): 1558-1567, 1992.

VAN DEN KERKHOF A.; HAESEBROUCK, F.; CHIERS, K.; DUCATELLE, R.; KAMP, E.M.; SMITS, M.A., Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine alveolar epithelial cell. **Infection and Immunity**, 64:(9), 3905-3907, 1996.

VAN LEENGOED, L.A.M.G. & DICKERSON, H.W., Influence of Calcium on Secretion and Activity of the Citolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**. 60: 353-359, 1992.

VAN OVERBEKE, I., CHIERS, K., CHARLIER, G., VANDENBERGHE, I., VAN BEEUMEN, J., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F., Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells, **Veterinary Microbiology**. 88: 59–74, 2002.

VANDEN BERGH, P.G.; ZECCHINON, L.L.; FETT, T.; DESMENCHT, D., Porcine CD18 mediates *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIII species-specific toxicity. **Veterinary Research**, 40:33, 2009.

WARD, C.K. and INZANA, T.J., Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular

polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. **Journal of Immunology** 153:2110-2121, 1994.

WARD, C.K; and INZANA, T.J., Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. **Infection and Immunity** 65:2491-2496, 1997

WELCH, R.A., Pore-Forming Cytolysins of Gram-Negative Bacteria. **Molecular Microbiology**. 5: 521-528, 1991.

XIE, F.; LEI, L.; DU, C.; LI, S.; HAN, W.; REN, Z., Genomic differences between *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 and 3 and the diversity distribution among 15 serotypes. **FEMS Microbiology Letters**. 303:147–155, 2010.

XU,F.; CHEN,X.; SHI, A.; YANG, B.; WANG,J.; LI,Y., Characterization and immunogenicity of an *apxIA* mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**. 118: 230–239, 2006.

XU, Z.; CHEN, X.; LI, L.; LI, T.; WANG, S.; CHEN, H.; ZHOU, R., Comparative Genomic Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**. 192: 5625-5636, 2010.

ZHAN, B.; ANGEN, O.; HEDEGGARD, J.; BENDIXEN, C.; PANITZ, F., Draft Genome Sequences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 2 and 6. **Journal of Bacteriology**. 192: 5846-5847, 2010.