

CIRO CÉSAR ROSSI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DIFERENTES SOROTIPOS DE
Actinobacillus pleuropneumoniae OBTIDOS NO SUDESTE DO BRASIL**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

CIRO CÉSAR ROSSI

Caracterização molecular de diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtidos no Sudeste do Brasil

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

APROVADA: 18 de julho de 2011

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Coorientadora)

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Coorientadora)

Prof^a Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof. Walter Vieira Guimarães

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli
(Orientadora)

“The eyes of others our prisons; their thoughts our cages”
Virginia Woolf

A Rodrigo e Elizabeth

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pelos anos de acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro durante este trabalho.

Ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade e empenho.

Ao corpo técnico-administrativo, em especial a Nilcéia, Elizabeth, Regina, Jaqueline, Sr. Paulo, Danilo e Evandro.

À professora e orientadora Denise Mara Soares Bazzolli, pelo interesse e entusiasmo pela minha pesquisa, pela confiança em meu trabalho, pela preocupação em me fazer aprender.

À professora Andréa de Oliveira Barros Ribon, pelos ensinamentos, por me iniciar na pesquisa e pelas oportunidades, que me permitiram obter tantas conquistas.

Às professoras Elza Fernandes de Araújo e Marisa Vieira de Queiroz, pelo trabalho inspirador, pela confiança e pelos tantos conhecimentos compartilhados.

À MICROVET, especialmente a Klédna e Mayka, pelo carinho e solicitude.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, pela receptividade e boa convivência.

A Jaque, Thammy e Maíra pelos bons momentos e risadas durante nossa convivência diária. Ao Alexandre pela ajuda e parceria.

Aos amigos que mantive e aos que conquistei, Dani, Rob, Ananda, Mônica, Maíra e Sol, pelo carinho e companhia.

À minha pequena família, por se preocupar com a minha felicidade e não me deixar tirar o pé do chão.

A Rodrigo e Elizabeth, por me fazerem querer o melhor de mim.

ÍNDICE

Caracterização molecular de diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtidos no Sudeste do Brasil

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. Introdução	01
2. Revisão bibliográfica	02
2.1. Panorama da suinocultura brasileira	02
2.2. Doenças respiratórias em suínos	03
2.3. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> : características gerais	04
2.4. Pleuropneumonia suína e principais fatores de virulência de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	05
2.5. Métodos de estudo visando diagnóstico e sorotipagem	08
3. Referências bibliográficas	11

Capítulo 1 - Frente a frente com *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Caracterização da variabilidade genética de isolados clínicos obtidos na região sudeste do Brasil

Resumo	16
1. Introdução	17
2. Material e métodos	20
2.1. Micro-organismos e condições de cultivo	20
2.2. Extração de DNA de <i>A. pleuropneumoniae</i>	20
2.3. Genotipagem dos isolados de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	21
2.3.1. PCR multiplex	21
2.3.2. Análise de restrição do gene <i>apxIVA</i> obtido por (PCR-REA).....	22
2.3.3. Investigação da presença e do número de cópias do elemento transponível IS <i>Apl1</i> nos isolados clínicos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	23
2.4. Caracterização molecular dos isolados de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> por ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG) ₅ -PCR.....	24
3. Resultados	25
3.1. Genotipagem dos isolados de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	25
3.1.1. PCR multiplex das toxinas <i>apx</i>	25
3.1.2. Análise de restrição de PCR (PCR-REA) dos isolados de sorotipo duvidoso com o gene <i>apxIVA</i>	27

3.1.3. Investigação da presença do elemento transponível IS <i>Apl1</i> nos isolados de <i>A. pleuropneumoniae</i>	29
3.4. Caracterização dos isolados de <i>A. pleuropneumoniae</i> por fingerprinting utilizando as técnicas de ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG) ₅ -PCR	31
4. Discussão	38
Agradecimentos	45
Referências bibliográficas	45
Material suplementar	49
Capítulo 2 - Caracterização do gene <i>omIA</i> em diferentes sorotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>: uma nova visão de uma antiga abordagem	
Resumo	53
1. Introdução	54
2. Material e métodos	56
2.1 Micro-organismos, condições de cultivo e manutenção	56
2.2 Manipulação de DNA	56
2.3 Obtenção das sequências de nucleotídeos	57
2.4. Análise estrutural do gene <i>omIA</i>	58
2.5. Análise estrutural da proteína OmlA	58
2.6. Análise filogenética molecular	59
2.7. Estudo da organização do gene <i>omIA</i> em isolados de <i>A. pleuropneumoniae</i>	60
3. Resultados	60
3.1. Análise das sequências	60
3.2. Análise estrutural do gene <i>omIA</i>	62
3.3. Análise estrutural da proteína OmlA	65
3.4. Análise filogenética	67
3.5. Organização do gene <i>omIA</i> em isolados clínicos de <i>A. pleuropneumoniae</i>	72
4. Discussão	73
Agradecimentos	79
Referências bibliográficas	80
Material suplementar	85
CONCLUSÕES GERAIS.....	87

RESUMO

ROSSI, Ciro César. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.
Caracterização molecular de diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtidos no Sudeste do Brasil. Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-orientadoras: Marisa Vieira de Queiroz, Elza Fernandes de Araújo e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Actinobacillus pleuropneumoniae é o principal micro-organismo responsável pela pleuropneumonia suína. A existência de 15 diferentes sorotipos descritos para esta bactéria, com diferentes graus de virulência, torna de grande importância a sorotipagem, o estudo de fatores de virulência e o acesso à variabilidade genética de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae*. Este trabalho demonstrou a aplicabilidade de duas técnicas de PCR (PCR multiplex com os genes *apx* e PCR-REA com o gene *apxIVA*) previamente desenvolvidas na caracterização dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e representou o primeiro estudo de variabilidade genética desta bactéria no Brasil, padronizando técnicas moleculares inéditas no estudo deste micro-organismo. Os resultados mostram que os 91 isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* utilizados neste trabalho são dos sorotipos 2, 5, 7 e 8. Uma grande variabilidade genética nos isolados foi observada examinados pelas técnicas de ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR, o que pode estar relacionado à presença, em elevado número de cópias, do elemento transponível IS*Apl1* no genoma dos micro-organismos, uma vez que o genoma desta bactéria é relativamente pequeno (2,2 Mpb). A reação de BOX-PCR, particularmente, proporcionou um maior poder discriminativo, uma vez que um fragmento específico para isolados de *A. pleuropneumoniae* foi observado e a técnica permitiu a separação dos isolados em um maior número de grupos com base em características em comum, como sorotipo, região e ano de isolamento. Adicionalmente, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para caracterizar o gene *omIA*, que codifica uma proteína da membrana externa de *A. pleuropneumoniae* e constitui um fator de virulência nesta bactéria. As análises demonstraram a conservação no promotor do gene e a existência de uma região conservada na estrutura da proteína OmlA, provavelmente envolvida na ligação da proteína à membrana da bactéria. O grande polimorfismo presente nas sequências interna e final do gene *omIA* dos 15 sorotipos permitiu separá-los por reconstrução filogenética e demonstrou a possível diferenciação destes sorotipos em dois eventos evolutivos distintos.

ABSTRACT

ROSSI, Ciro César. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.
Molecular characterization of different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtained in Southeastern Brazil. Adviser: Denise Mara Soares Bazzolli. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz, Elza Fernandes de Araújo and Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Actinobacillus pleuropneumoniae is the main microorganism responsible for porcine pleuropneumonia. The existence of 15 different serotypes described for this bacterium, showing distinct degrees of virulence, highlights the importance of serotyping, the study of virulence factors and the access to the genetic variability of clinical isolates of *A. pleuropneumoniae*. This work demonstrated the applicability of two PCR techniques (multiplex PCR with *apx* genes and PCR-REA with *apxIVA*) previously developed in the characterization of the serotypes of *A. pleuropneumoniae* and represented the first study of genetic variability of this bacterium in Brazil, standardizing unpublished molecular techniques in the study of this microorganism. The results show that the 91 clinical isolates used in this work belong to the serotypes 2, 5, 7 or 8. A great genetic variability was observed in the isolates examined by the techniques of ERIC-PCR, BOX-PCR and (GTG)₅-PCR, which may be related to the presence, in a high number of copies, of the transposable element IS*Apl1* in the microorganisms genomes. The reaction of BOX-PCR, particularly, provided a higher discriminative power, once a specific fragment was observed to *A. pleuropneumoniae* and the technique allowed the separation of the isolates in a higher number of groups based in common characteristics, such as serotypes, region and year of isolation. Additionally, bioinformatics techniques were adopted to characterize the gene *omIA*, which codes a external membrane protein and consists a virulence factor in *A. pleuropneumoniae*. The analysis showed the conservation of the gene promoter and the existence of a conserved region in the structure of the protein OmlA, probably involved in the attachment of the protein to the bacterium membrane. The great polymorphism present in the internal and final sequences of the gene *omIA* of the 15 serotypes allowed their separation by phylogenetic reconstruction and demonstrated their possible differentiation in two distinct evolutionary events.

1. INTRODUÇÃO

Doenças respiratórias são responsáveis por significativas perdas econômicas na atividade de suinocultura (Stark, 2000; Thacker e Thanawongnuwech, 2002). Neste contexto, a pleuropneumonia configura-se como uma das mais importantes e severas moléstias, a qual é caracterizada por pneumonia e pleurite fibrinosa, necrótica e hemorrágica (Shin et al., 2007). Existem relatos de casos de pleuropneumonia em todos os países em que a suinocultura é intensiva. No Brasil, este tipo de pneumonia foi relatado pela primeira vez em 1981. Desde então vários surtos foram descritos, principalmente no Sul do país, onde a suinocultura é praticada de forma mais intensiva (Piffer et al., 1987). Os danos econômicos consequentes da pleuropneumonia suína podem ser severos e a importância da infecção deriva do fato de que ela pode resultar em diminuição da média diária de ganho de peso e índices de conversão alimentar (razão entre quantidade total de ração fornecida e ganho de massa corporal), perdas por necessidade de abate e gastos com intervenções, como medicação e vacinação, além da morte do animal (Kim e Lee, 2006; Marsteller e Fenwick, 1999; Taylor, 1999).

O principal micro-organismo causador da pleuropneumonia suína é a bactéria Gram-negativa *Actinobacillus pleuropneumoniae*. São conhecidos 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, definidos com base em propriedades antigênicas dos polissacarídeos da membrana externa da parede celular. Embora todos os sorotipos possam causar a doença, existem diferenças na virulência entre eles (Schuchert et al., 2004). Por isso, a sorotipagem e o acesso à variabilidade genética de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* são fatores chave no estudo epidemiológico e no controle da doença, uma vez que a prevalência e a virulência dos diferentes sorotipos podem variar entre países e regiões (Dubreuil et al., 2000).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos o estudo molecular de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados de animais doentes em granjas localizadas na região sudeste do Brasil, uma das principais regiões envolvidas com a suinocultura no país.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Panorama da suinocultura brasileira

A produção de carne suína mundial em 2010 foi estimada em torno de 101 milhões de toneladas, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Mezoughem e Taulman, 2009). Deste total, aproximadamente 50% é produzida e consumida pela China. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (EMBRAPA - CNPSA) estima que, em 2009, foram produzidas aproximadamente 3,0 milhões de toneladas de carne suína no Brasil. Aproximadamente 20% desta produção foram destinados à exportação, o que coloca o país na terceira posição dentre os maiores países produtores e exportadores de carne suína (Mezoughem e Taulman, 2009; Roppa, 2005). Estudos revelam que mais de 730 mil brasileiros dependem diretamente da suinocultura e mais de 2,7 milhões de pessoas estão envolvidos na cadeia produtora de carne suína (Cameron, 2000).

A distribuição regional da suinocultura no Brasil revela que os Estados da região Sul são os principais produtores de carne suína. Estes contam com uma produção de 1,7 milhões de toneladas por ano, contra aproximadamente 0,5 milhão dos Estados da região Sudeste. O Estado de Minas Gerais é o quarto mais importante Estado do país na suinocultura, responsável pela produção de 357 mil toneladas de carne suína em 2009, segundo a EMBRAPA - CNPSA.

O bom desempenho econômico da suinocultura brasileira deve-se aos avanços tecnológicos e organizacionais incorporados ao longo das duas últimas décadas (Miele e Waqui, 2007). Entretanto, a modernização do sistema mundial de criação de suínos tem aumentado o número de animais confinados em um espaço limitado. Juntamente com situações de manejo e questões ambientais, como umidade e temperatura e circunstâncias estressantes para o animal, este confinamento tem contribuído para o aparecimento de enfermidades no trato respiratório (Christensen, 1999; Costa et al., 2004).

2.2. Doenças respiratórias em suínos

O termo *Complexo de Doenças Respiratórias em Suínos* (PRDC, do inglês *Porcine Respiratory Disease Complex*) tem sido comumente utilizado para designar enfermidades respiratórias de etiologia multifatorial observadas em suínos próximos do abate ou em época de engorda (Woeste e Grosse Beilage, 2007). Dentre as diversas características observadas no animal, destacam-se a deficiência no ganho de peso, crescimento lento, anorexia, letargia, febre, tosse e dificuldade de respiração (Bochev, 2007; Brockmeier et al., 2002). As doenças mais prevalentes são a pneumonia, pleuropneumonia e pleurite (Stark, 2000). Estas doenças geralmente levam a uma alta taxa de morbidade, enquanto a mortalidade é dependente dos vários possíveis agentes causadores. As taxas de morbidade variam de 10% a 40% e a mortalidade de 2% a 20% (Harms et al., 2002; Stark, 2000).

Segundo Stark (2000), existem diversos fatores de risco que podem aumentar a possibilidade da ocorrência de doenças respiratórias em rebanhos suínos. Dentre elas estão características do próprio rebanho, como o número de animais e o volume de ar compartilhado no ambiente de criação; características de manejo, como o acesso a água, ventilação, luz calor e higiene; parâmetros do ar compartilhado, como temperatura, umidade e poeira, bem como aspectos sazonais; e finalmente, características da vizinhança, já que a presença de criatórios próximos com histórico de doenças respiratórias pode também representar um fator de risco.

Os patógenos mais comumente relacionados ao complexo de doenças respiratórias em suínos são o Vírus da Infertilidade e da Síndrome Respiratória Suína (PRRSV, *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus*), *Mycoplasma hyopneumoniae* e o vírus Influenza Suíno (Stark, 2000; Thacker e Thanawongnuwech, 2002). À medida que o número de organismos patogênicos aumenta, a severidade das doenças respiratórias também se torna maior. Patógenos como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, e *Actinobacillus pleuropneumoniae* são também importantes na etiologia de pneumonia e podem estar associados ao Complexo de doenças respiratórias em suínos (Stark, 2000; Thacker e

Thanawongnuwech, 2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae* é o agente etiológico da pleuropneumonia suína, que se configura como uma importante e severa enfermidade, caracterizada por pneumonia e pleurite fibrinosa, necrótica e hemorrágica, sendo um importante patógeno em suínos (Shin et al., 2007).

2.3. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: características gerais

Actinobacillus pleuropneumoniae foi isolada pela primeira vez nos EUA, em 1957, por Pattison, e em 1964 por Shope na Argentina (Coelho et al., 2004). Anteriormente denominada *Haemophilus pleuropneumoniae*, foi reclassificada como membro do gênero *Actinobacillus*, baseado em uma análise feita por hibridização de DNA e de características fenotípicas, que o colocaram próximo à espécie *Actinobacillus lignieresii* (Pohl et al., 1983). Além disso, os dados de proximidade de sequência de DNA claramente indicaram que o organismo *H. pleuropneumoniae* pertencia ao gênero *Actinobacillus* e que este organismo não era significativamente relacionado à bactéria *H. influenzae*, o que levou Pohl et al. (2003) a proporem a nova classificação.

O gênero *Actinobacillus* consiste em um grupo de cocobacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos ou microaerofílicos, não formadores de esporos e não móveis, da família Pasteurellaceae. Actinobacilos crescem em meios contendo sangue e soro em temperaturas entre 20°C e 42°C (Biberstein e Hirsh, 2003). Em meios de cultivo apropriados, as espécies do gênero turvam o caldo nutriente em 24 – 48 horas e em ágar produzem colônias de aproximadamente 1mm de diâmetro. Algumas linhagens de *A. pleuropneumoniae* requerem a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como fator de crescimento (aproximadamente 1µg/mL).

O requerimento de NAD para o crescimento das linhagens de *A. pleuropneumoniae* caracteriza esta bactéria em dois biótipos. Segundo Pohl et al. (2003), bactérias do biótipo 1 requerem NAD para o crescimento, enquanto as do biótipo 2, que são menos comuns, não. Em adição, existem 15 sorotipos (todos do biótipo 1), definidos com base em propriedades antigênicas dos polissacarídeos da cápsula e lipopolissacarídeos da parede celular. Os sorotipos 1 e 5 são ainda subdivididos em subtipos *a* e *b* (Dubreuil et al., 2000;

Schuchert et al., 2004). O polissacarídeo capsular é o principal antígeno sorotipo-específico, o que o torna um importante antígeno para o uso em testes de diagnóstico. Embora todos os sorotipos possam causar doença, existem diferenças na virulência (Schuchert et al., 2004). No Brasil, um estudo recente apontou a prevalência dos sorotipos 3, 5, 6, 7 e 10, embora muitas amostras não tenham sido eficientemente sorotipadas devido à ocorrência de reações cruzadas (Kuchiishi et al., 2007).

2.4. Pleuropneumonia suína e principais fatores de virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Diferentes espécies de *Actinobacillus* são capazes de causar doenças respiratórias. No gênero *Actinobacillus*, as espécies *A. lignieresii*, *A. equuli*, *A. suis*, *A. seminis*, *A. actinomycetemcomitans* e *A. pleuropneumoniae* são todas patógenos de animais, principalmente bovinos, ovinos, suínos e equinos. No entanto, somente *A. equuli*, *A. suis* e *A. pleuropneumoniae* são comumente encontradas em suínos, sendo a primeira responsável pelo desenvolvimento de artrite e enterite e as duas últimas por enfermidades respiratórias – pneumonia e pleuropneumonia, respectivamente (Quin et al., 2005).

A pleuropneumonia suína é uma doença contagiosa causada por *A. pleuropneumoniae* e é uma das mais importantes doenças respiratórias suínas que ocorre em quase todos os países, acarretando elevadas perdas econômicas em todas as idades (Coelho et al., 2004). Em geral, o agente infeccioso é transportado pelo ar ou transmitido diretamente por um animal portador que geralmente sofre de uma infecção crônica ou subclínica (Dubreuil et al., 2000). Ele coloniza o tecido se aderindo ao muco, proteínas e células do hospedeiro, permitindo a multiplicação e produção de substâncias, o que resulta em danos severos no local (Chiers et al., 2010).

O início da doença geralmente é repentino e alguns animais podem morrer sem demonstrar sinais clínicos. Infecções respiratórias agudas, subagudas e crônicas são observadas (Carter e Wise, 2004). A infecção aguda ou superaguda caracteriza-se por temperatura corporal em torno de 41°C, letargia, dispnéia e cianose, além da presença do desenvolvimento de

broncopneumonia necrosante e hemorrágica, com exsudação de fibrina, causando pleurite; e geralmente tem um prognóstico fatal (Vaz e Silva, 2004). Em muitos casos, é possível que a morte dos animais ocorra em até 24 horas (Biberstein, 1994). Os sobreviventes apresentam tosse intermitente e ganhos de peso insatisfatórios (Biberstein e Hirsh, 2003). A forma crônica, que geralmente ocorre em abatedouros, constitui a origem dos problemas persistentes de rebanho. Esta é caracterizada por pleurisia (inflamação das pleuras pulmonares), adesões pleurais, sequestro pulmonar e formação de abscessos (Biberstein e Hirsh, 2003; Carter e Wise, 2004). O sequestro pulmonar refere-se à situação em que uma porção do tecido do pulmão recebe seu suprimento sanguíneo de uma artéria sistêmica anômala (Corbett e Humphrey, 2004). Acredita-se que complexos entre antígenos (endotoxinas) e anticorpos levam a danos no endotélio dos vasos sanguíneos e resultam em vasculites, trombose com conseqüente edema, necrose, infarto e hemorragia (Corbett e Humphrey, 2004).

A patogênese da pleuropneumonia suína é complexa, envolvendo diferentes fatores de virulência produzidos pela bactéria (Chiers et al., 2010). Dentre estes, as toxinas Apx são reconhecidas como os principais (Vanden Bergh et al., 2008). Embora a virulência seja multifatorial, dados de epidemiologia molecular revelam que a severidade da doença está fortemente relacionada à produção e secreção de uma variedade de exotoxinas, como ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV. Baseado nas características de suas estruturas as toxinas Apx são classificadas como membros da família RTX (*Repeat in toxin*), proteínas formadoras de poros (Chien et al., 2009; Vanden Bergh et al., 2009). As toxinas RTX são membros de uma família de proteínas que são sintetizadas por um grupo diversificado de patógenos Gram-negativos. Membros da família de toxinas RTX, incluindo toxinas citolíticas, metaloproteases e lipases, todas dividem uma organização gênica semelhante e distintas características estruturais (Lally et al., 1999). Estruturalmente, estas toxinas são organizadas em domínios hidrofóbicos na extremidade N-terminal e repetições de nonapeptídeos na extremidade C-terminal, que é o domínio que se liga a Ca^{2+} (Wang et al., 2007). Embora variações existam, o operon genérico de uma toxina RTX consiste de quatro genes que são designados *rtxC*, *A*, *B* e *D*, de

acordo com a ordem em que são transcritos (Lally et al., 1999). Nestes operons, *rtxA* corresponde ao gene estrutural da toxina, o produto do gene C é requerido para a ativação pós-traducional da toxina, e os produtos dos genes B e D são requeridos para a secreção da toxina (Jarma e Regassa, 2004). O passo de ativação é obtido pela acilação do produto estrutural do gene *rtxA* e requer a participação do produto do gene *rtxC*, e de uma proteína acil-carreadora (Lally et al., 1999).

A presença de genes individuais nos operons das diferentes toxinas Apx é constante em um determinado sorotipo e reflete a produção, bem como o potencial de secretar ApxI, ApxII e ApxIII toxins (Ramjeet et al., 2008b). Os quinze diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae* produzem combinações diferentes das toxinas Apx, em que os sorotipos 1, 5, 9 e 11 produzem as toxinas ApxII e ApxIII; os sorotipos 2, 3, 4, 6, 8 e 15 produzem ApxII e ApxIII; os sorotipos 7, 12, e 13 expressam apenas ApxII, enquanto os sorotipos 10 e 14 produzem apenas ApxI. Em adição, a toxina ApxIV é produzida por todos os sorotipos (Cho e Chae, 2001; Schaller et al., 1999). As toxinas Apx apresentam graus variados de atividades hemolítica e citotóxica (Chien et al., 2009).

Presente em diversos micro-organismos, a cápsula polissacarídica é um importante fator de virulência e um dos principais componentes que protegem a bactéria das defesas do hospedeiro, devido a suas propriedades antifagocíticas (Carter e Wise, 2004; Dubreuil et al., 2000). Mutantes de *A. pleuropneumoniae* não-encapsulados têm sua virulência atenuada em suínos, indicando a importância da cápsula no grau de capacidade de causar doença pelo microrganismo (Bandara et al., 2003).

Além da cápsula, os polissacarídeos presentes na camada polissacarídica (LPS) geralmente têm um importante papel na virulência (Jacques, 2004). Neste sentido, foi demonstrada a função do LPS na adesão ao muco e anéis da traquéia de suínos, sendo que o *core* de oligossacarídeos aparentemente é o principal envolvido neste fenômeno (Chiers et al., 2010; Paradis et al., 1999). Foi demonstrado, através da obtenção de mutantes, que uma região core-lípido A intacta é requerida para máxima proteção de *A. pleuropneumoniae* contra alguns peptídeos antimicrobianos catiônicos e que a deleção de resíduos específicos da região externa do LPS resulta na atenuação da

virulência em um isolado de *A. pleuropneumoniae* do sorotipo 1 (Ramjeet et al., 2005). O mesmo grupo de pesquisa demonstrou que existe uma interação entre a camada LPS e as toxinas ApxI e ApxII, realizada especificamente pelo resíduo de trissacarídeo GalNAc-Gal II-Gal I do *core* externo. A ausência da interação entre LPS e ApxI/II afetou a citotoxicidade e a virulência do isolado (Ramjeet et al., 2008a). Além disso, é reconhecido que o LPS de *A. pleuropneumoniae* apresenta forte atividade endotóxica. A alta sensibilidade dos suínos às endotoxinas liberadas durante as infecções por este organismo provoca esfoliação do tecido epitelial e facilita a disseminação no epitélio do trato respiratório e induz à pneumonia e ou choque (Vaz e Silva, 2004).

A. pleuropneumoniae contém ainda plasmídeos tipo R que conferem resistência a sulfonamidas, tetraciclina e penicilina (Biberstein e Hirsh, 2003). Recentemente, foi descoberto um plasmídeo contendo genes de resistência a multidrogas em uma cepa de *A. pleuropneumoniae* isolada na China. Pela análise do plasmídeo de 15079 kb, designado pHB0503, foi observada em sua sequência a presença de genes muito próximos ou quase idênticos a genes de resistência de plasmídeos pertencentes ou não à família Pasteurellaceae (Kang et al., 2009).

Em relação a flagelos, *A. pleuropneumoniae* era considerado um organismo não-flagelado. Contudo, recentemente foi demonstrado que *A. pleuropneumoniae* produz um flagelo composto por proteínas de 65 kDa com uma sequência aminoacídica N-terminal que apresenta 100% de identidade com flagelinas de *Escherichia coli*, *Salmonella*, e *Shigella* (Negrete-Abascal et al., 2003).

Outro fator de virulência relativamente pouco estudado é o produto do gene *omlA*, que codifica a proteína *OmlA* (*outer membrane lipid A*), que se liga à transferrina, com uma massa molecular calculada de 40 kDa, modificada por adição de lipídeos e está presente na membrana externa e em eventuais protuberâncias da membrana de *A. pleuropneumoniae* (Gerlach et al., 1992).

2.5. Métodos de estudo visando diagnóstico e sorotipagem

O diagnóstico da pleuropneumonia causada por *A. pleuropneumoniae* baseia-se no isolamento e identificação do agente a partir de lesões

características, recorrendo às técnicas utilizadas tradicionalmente em laboratório (Coelho et al., 2004). Culturas e testes bioquímicos finalizam a identificação da espécie (Biberstein e Hirsh, 2003). Todavia, dentre todos os patógenos envolvidos no complexo de doenças respiratórias em suínos, a detecção de *A. pleuropneumoniae* é considerada a mais difícil. Os exames bacteriológicos rotineiros feitos em amostras nasais e tonsilares não são sensíveis o suficiente, uma vez que o crescimento de *A. pleuropneumoniae* é comumente superado pelos micro-organismos da microbiota encontrada nos tecidos das amostras, o que dificulta a identificação visual (Bochev, 2008).

A habilidade de discriminação entre isolados de um patógeno bacteriano, como é o caso de *A. pleuropneumoniae*, é muito vantajosa na melhor compreensão da transmissão da doença e monitoramento de isolados virulentos e resistentes a antibióticos (Zhou et al., 2008). Desta forma, a sorotipagem de isolados de campo de *A. pleuropneumoniae*, como enfatizado anteriormente, é um fator chave no estudo epidemiológico e no controle da doença, uma vez que a prevalência e a virulência dos diferentes sorotipos podem variar entre países e regiões, o que torna importante não só a identificação do patógeno, como também a determinação correta do sorotipo da cepa isolada de um determinado animal (Dubreuil et al., 2000).

Um grande número de ensaios sorológicos foi desenvolvido para a caracterização de isolados de *A. pleuropneumoniae* (Jessing et al., 2003; Lacouture et al., 1997). Embora sejam ensaios imunológicos rápidos, estas técnicas apresentam como principal limitação o fato de comumente resultarem em reações cruzadas (Jessing et al., 2003). Reações cruzadas são definidas como reações entre um antígeno e um anticorpo que foi gerado contra um imunógeno diferente, mas similar; fazendo com que haja reação com ambos (Aalberse et al., 2001). Portanto, a classificação sorológica de isolados de *A. pleuropneumoniae* tem sido problemática devido à reatividade de alguns deles a mais de um dos antisoros policlonais sorotipo-específico (Lacouture et al., 1997; Mittal e Bourdon, 1991; Mittal et al., 1988; Mittal et al., 1993).

Diversas técnicas moleculares têm sido empregadas no diagnóstico e no estudo da epidemiologia molecular de diferentes patógenos bacterianos, com o objetivo de caracterizar a variabilidade genética de amostras envolvidas em

mortalidade, definição de grupos de amostras prevalentes e identificação da origem de amostras virulentas (Macêdo et al., 2009). Metodologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm complementado as formas sorológicas de detecção, tanto por contornarem o problema das reações cruzadas entre antígenos e anticorpos, como também por permitirem a caracterização de isolados que anteriormente haviam sido designadas como não sorotipáveis devido à auto-aglutinação (Lo et al., 1998). A detecção por PCR torna a sorotipagem extremamente sensível, além de permitir a análise direta de amostras sem a obrigatoriedade do isolamento e cultivo da bactéria (Lo et al., 1998). Neste contexto, a técnica baseada na detecção dos genes que codificam as toxinas *Apx* por PCR constitui uma ferramenta eficiente e rápida para a classificação dos isolados e o respectivo agrupamento em relação ao sorotipo, o que já foi demonstrado por diversos grupos de pesquisa (Gram et al., 2000; Guo-Sheng et al., 2006; Rayamajhi et al., 2005; Sthitmatee et al., 2003).

Embora a pleuropneumonia suína tenha sido identificada pela primeira vez no Brasil em 1981, não existem ainda no país estudos epidemiológicos de amplitude elevada que propiciem um conhecimento aprofundado do panorama atual da doença em suínos no país; menos dados ainda tem-se para a região Sudeste.

Adicionalmente, a escassez de informação em relação às diferenças genéticas entre os 15 sorotipos atualmente conhecidos de *A. pleuropneumoniae* tem dificultado o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que sejam capazes de identificar sorotipos diferentes e a criação de vacinas multivalentes efetivas. Portanto, as diferenças genômicas entre os principais sorotipos devem ser identificadas e apropriadamente exploradas (Xie et al., 2010).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar a caracterização molecular de diferentes sorotipos *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados de animais com sinais clínicos de pleuropneumonia em granjas localizadas na região sudeste do Brasil.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalberse, R.C., Akkerdaas, J., van Ree, R., 2001, Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 56, 478-490.
- Bandara, A.B., Lawrence, M.L., Veit, H.P., Inzana, T.J., 2003, Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect Immun* 71, 3320-3328.
- Biberstein, E.L., Hirsh, D.C., 2003, *Actinobacillus*, In: Hirsh, D.C., Zee, Y.C. (Eds.) *Microbiologia Veterinária*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, p. 446.
- Bochev, I., 2007, Porcine respiratory disease complex (PRDC): a Review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 10, 131 - 146.
- Bochev, I., 2008, Porcine Respiratory Disease complex (PRDC): A Review. II. Diagnostics, treatment and prevention *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 11, 219 - 234.
- Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., Thacker, E.L., 2002, Chapter 13: Porcine Respiratory Disease Complex, In: Brogden, K.A.G., J.M. (Ed.) *Polymicrobial Diseases*. ASM Press, Washington (DC), p. 450.
- Cameron, R.D.A., 2000, A review of the industrialisation of pig production worldwide with particular reference to the asian region. *Animal Health and Area-wide Integration*, 1-61.
- Carter, G.R., Wise, D.J., 2004, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, In: Carter, G.R., Wise, D.J. (Eds.) *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Iowa State Press, Ames, Iowa.
- Chien, M.S., Chan, Y.Y., Chen, Z.W., Wu, C.M., Liao, J.W., Chen, T.H., Lee, W.C., Yeh, K.S., Hsuan, S.L., 2009, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived Apxl induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* 135, 327-333.
- Chiers, K., De Waele, T., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2010, Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res* 41, 65.
- Cho, W.S., Chae, C., 2001, Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Comp Pathol* 125, 34-40.
- Christensen, G., 1999, Diseases of the respiratory system, In: Straw, S.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine*. Iowa State University Ames - Iowa, pp. 913-940.
- Coelho, A.C., Vieira-Brito, F.J., Vieira-Brito, M.G., Rodrigues, J., 2004, Swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* – diagnosis and strategies of control. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 99, 193 - 198.
- Corbett, H.J., Humphrey, G.M., 2004, Pulmonary sequestration. *Paediatr Respir Rev* 5, 59-68.
- Costa, M.M., Klein, C.S., Collares, R.M., Vaz, C.S.L., Balestrim, R., Schrank, A., Silva, S.C., Piffer, I.A., Shrank, I.S., 2004, Phenotypic, genotypic and diagnostic aspects of the bacterium *A. pleuropneumoniae*. *Ciência Rural* 34, 1305 - 1313.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., Gottschalk, M., 2000, *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 1, 73 - 93.

- Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S., Willson, P.J., 1992, Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 60, 892-898.
- Gram, T., Ahrens, P., Andreassen, M., Nielsen, J.P., 2000, An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol* 75, 43-57.
- Guo-Sheng, X.I.A.O., San-Jie, C.A.O., Li-li, D.U.A.N., Xin-tian, W.E.N., Xiao-Ping, M.A., Hua-mei, C.H.E.N., 2006, Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by multiplex PCR based on the genes *ApxlVA* and *OmlA*. *Agricultural Sciences in China* 5, 146 - 154.
- Harms, P.A., Halbur, P.G., Sorden, S.D., 2002, Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production* 10, 27-30.
- Jacques, M., 2004, Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* 68, 81-85.
- Jarma, E., Regassa, L.B., 2004, Growth phase mediated regulation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* *Apxl* and *ApxlII* toxins. *Microb Pathog* 36, 197-203.
- Jessing, S.G., Angen, O., Inzana, T.J., 2003, Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 41, 4095-4100.
- Kang, M.S., Zhou, R., Liu, L., Langford, P.R., Chen, H.C., 2009, Analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multi-resistance plasmid, pHB0503. *Plasmid* 61, 135-139.
- Kim, T., Lee, J., 2006, Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Protein Expr Purif* 45, 235-240.
- Kuchiishi, S.S., Kich, J.D., Ramenzoni, M.L.F., Spricigo, D., Klein, C.S., Fávero, M.B.B., Piffer, I.A., 2007, Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Brazil from 1993 to 2006. *Acta Sci Vet* 35, 79-82.
- Lacouture, S., Mittal, K.R., Jacques, M., Gottschalk, M., 1997, Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 337-341.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, L.R., Korostoff, J., 1999, The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends in Microbiology* 7, 356-361.
- Lo, T.M., Ward, C.K., Inzana, T.J., 1998, Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 36, 1704-1710.
- Macêdo, N.R., Oliveira, S.R., Lage, A.P., Guedes, R.M.C., 2009, Molecular epidemiology of *Haemophilus parasuis*. *Ciência Rural* 39, 2576-2582.
- Marsteller, T.A., Fenwick, B., 1999, *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health and Production* 7, 161-165.
- Mezoughem, C., Taulman, L., 2009, Livestock and poultry: world markets and trade. United States Department of Agriculture - Foreign Agricultural Service October 2009, 31.
- Miele, M., Waqui, P.D., 2007, Estrutura e dinâmica dos contratos na suinocultura de Santa Catarina: um estudo de casos múltiplos. *Estudos econômicos* 37, 817-847.

- Mittal, K.R., Bourdon, S., 1991, Cross-reactivity and antigenic heterogeneity among *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype-4 and serotype-7. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 1344-1347.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., 1988, Quantitation of serotype-specific and cross-reacting group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6, and 8. *J Clin Microbiol* 26, 985-989.
- Mittal, K.R., Kamp, E.M., Kobisch, M., 1993, Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. *Res Vet Sci* 55, 179-184.
- Negrete-Abascal, E., Reyes, M.E., Garcia, R.M., Vaca, S., Giron, J.A., Garcia, O., Zenteno, E., De La Garza, M., 2003, Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol* 185, 664-668.
- Paradis, S.E., Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., Archambault, M., Jacques, M., 1999, Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Current Microbiology* 39, 313-0320.
- Piffer, I.A., Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Barcellos, D.E.S.N., 1987, Sorotipos de *Haemophilus (Actinonacillus) pleuropneumoniae* isolados de suínos No Brasil. *Comunicado Técnico, EMBRAPA-CNPSA*. 118, 1-3.
- Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W., Mannheim, W., 1983, Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haerolytica*-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.
- Quin, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnely, W.J.C., Leonard, F.C., 2005, O gênero *Actinobacillus*, In: Quin, P.J. (Ed.) *Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas*. Artmed, Porto Alegre, p. 512.
- Ramjeet, M., Cox, A.D., Hancock, M.A., Mourez, M., Labrie, J., Gottschalk, M., Jacques, M., 2008a, Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, galU, affects LPS interaction with the RTX toxins ApxI and ApxII and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Mol Microbiol* 70, 221-235.
- Ramjeet, M., Deslandes, V., Goure, J., Jacques, M., 2008b, *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim Health Res Rev* 9, 25-45.
- Ramjeet, M., Deslandes, V., St Michael, F., Cox, A.D., Kobisch, M., Gottschalk, M., Jacques, M., 2005, Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Biol Chem* 280, 39104-39114.
- Rayamajhi, N., Shin, S.J., Kang, S.G., Lee, D.Y., Ahn, J.M., Yoo, S.Y., 2005, Development and use of a polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 359 - 362.
- Roppa, L., 2005, Global Pig Meat Production. Banff Pork Seminar, Alberta Pork.

- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., Frey, J., 1999, Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145 (Pt 8), 2105-2116.
- Schuchert, J.A., Inzana, T.J., Angen, O., Jessing, S., 2004, Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42, 4344-4348.
- Shin, S.J., Shin, S.W., Kang, M.L., Lee, D.Y., Yang, M.S., Jang, Y.S., Yoo, H.S., 2007, Enhancement of protective immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA or ApxIIA in mice. *J Vet Sci* 8, 383-392.
- Stark, K.D., 2000, Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine--a literature review. *Vet J* 159, 37-56.
- Sthitmatee, N., Sirinarumit, T., Makonkewkeyoon, L., Sakpuaram, T., Tesaprateep, T., 2003, Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx genes. *Mol Cell Probes* 17, 301-305.
- Taylor, D.J., 1999, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 343-354.
- Thacker, E., Thanawongnuwech, R., 2002, Porcine respiratory disease complex. *Thai J. Vet. Med.* 32, 125 - 134.
- Vanden Bergh, P.G., Zecchinon, L.L., Fett, T., Desmecht, D., 2008, Probing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIIA toxin-dependent cytotoxicity towards mammalian peripheral blood mononucleated cells. *BMC Res Notes* 1, 121.
- Vanden Bergh, P.G., Zecchinon, L.L., Fett, T., Desmecht, D., 2009, Porcine CD18 mediates *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIII species-specific toxicity. *Vet Res* 40, 33.
- Vaz, C.S.L., Silva, S.C., 2004, Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína. *Ciência Rural* 34, 635 - 643.
- Wang, C., Liu, S., Peng, Y., Shao, M., Wang, Y., Gong, Q., Chang, Y., Liu, J., Liu, H., Liu, D., Kong, X., 2007, Renaturation and purification of ApxII toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Protein Expr Purif* 52, 441-445.
- Woeste, K., Grosse Beilage, E., 2007, [Transmission of agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC) between swine herds: a review. Part 1--diagnosis, transmission by animal contact]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 114, 324-326, 328-337.
- Xie, F., Lei, L., Du, C., Li, S., Han, W., Ren, Z., 2010, Genomic differences between *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 and 3 and the diversity distribution among 15 serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 303, 147-155.
- Zhou, L., Jones, S.C.P., Angen, O., Bosse, J.T., Nash, J.H.E., Frey, J., Zhou, R., Chen, H.C., Kroll, J.S., Rycroft, A.N., Langford, P.R., 2008, Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 800-803.

Capítulo 1

FRENTE A FRENTE COM *Actinobacillus pleuropneumoniae*: CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DO SUDESTE DO BRASIL

Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista Veterinary Microbiology

RESUMO

ROSSI, Ciro César. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.

Frente a frente com *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Caracterização da variabilidade genética de isolados clínicos do sudeste do Brasil.

Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli. Co-orientadoras: Marisa Vieira de Queiroz, Elza Fernandes de Araújo e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Actinobacillus pleuropneumoniae é o agente causador da pleuropneumonia suína, uma importante enfermidade na cadeia da suinocultura. A sorotipagem e a caracterização molecular de isolados desta bactéria consistem em importantes estratégias no estudo da doença em uma determinada área, uma vez que o micro-organismo se apresenta em 15 distintos sorotipos, que por sua vez, apresentam diferentes graus de virulência. A sorotipagem, feita por técnicas imunológicas é ainda limitada pela ocorrência de reações cruzadas. Neste trabalho, PCR multiplex com os genes *apx* e PCR-REA com o gene *apxIVA* foram realizadas para definir os sorotipos de 91 isolados clínicos obtidos no Sudeste do Brasil. A variabilidade genética foi acessada por técnicas de *rep*-PCR, em que o poder discriminativo das técnicas de ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR, inéditas no estudo de *A. pleuropneumoniae* foi investigado. As técnicas de PCR multiplex e PCR-REA permitiram caracterizar 96 % dos isolados e revelaram que os isolados estudados pertencem aos sorotipos 2, 5, 7 e 8. As técnicas de *rep*-PCR evidenciaram a grande variabilidade genética apresentada pelos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* e a reação de BOX-PCR foi a que apresentou melhores resultados, permitindo agrupar um maior número de isolados com características em comum, como sorotipo, ano ou região de isolamento, além de apresentar um fragmento forte de aproximadamente 1,2 kb específico para *A. pleuropneumoniae*. A grande variabilidade genética observada pode estar relacionada à presença do elemento transponível ISAp1 em um grande número de cópias no genoma dos isolados, o que foi observado por triagem por PCR para a transposase e por *Southern blotting*. Estes resultados validam o uso de PCR multiplex e PCR-REA no estudo de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* e demonstram técnicas no estudo da variabilidade genética deste micro-organismo, representando um avanço na investigação das características genéticas desta bactéria.

1. INTRODUÇÃO

A pleuropneumonia suína é uma enfermidade que causa prejuízos econômicos significativos em todos os países que praticam a suinocultura de forma intensiva. A bactéria Gram-negativa *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pertencente à família Pasteurellaceae, é o principal agente causal da doença, sendo esta caracterizada por pneumonia e pleurite fibrinosa, necrótica e hemorrágica (Shin et al., 2007).

A *pleuropneumoniae* é caracterizada em dois biótipos, de acordo com o requerimento obrigatório (biótipo 1) ou não obrigatório (biótipo 2) de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para o crescimento, sendo que as bactérias envolvidas com a pleuropneumonia geralmente pertencem ao biótipo 1 (Serrano-Rubio et al., 2008). Além dos biótipos, são relatados atualmente 15 sorotipos diferentes, definidos com base em propriedades antigênicas dos polissacarídeos da cápsula e lipopolissacarídeos da parede celular (Blackall et al., 2002). Os sorotipos 1 e 5 ainda são subdivididos em subtipos *a* e *b* (Dubreuil et al., 2000; Schuchert et al., 2004).

Embora a virulência bacteriana seja multifatorial, a severidade da doença causada por *A. pleuropneumoniae* está fortemente relacionado à produção e secreção de uma variedade de exotoxinas da família *Repeat in toxin* (RTX), como ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV (Frey, 1995). Estas toxinas apresentam graus variados de atividades, hemolítica e citotóxica (Chien et al., 2009). Os 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* produzem combinações diferentes das toxinas Apx, sendo as toxinas ApxI e ApxIII produzidas pelos sorotipos 1, 5, 9 e 11, as toxinas ApxII e ApxIII produzidas pelos sorotipos 2, 3, 4, 6, 8 e 15, a toxina ApxII pelos sorotipos 7, 12, e 13 e somente a toxina ApxI pelos sorotipos 10 e 14 (Cho e Chae, 2001; Schaller et al., 1999). Em contrapartida, a toxina ApxIV é produzida por todos os sorotipos, o que torna a amplificação do gene *apxIVA* de grande utilidade na identificação e confirmação de *A. pleuropneumoniae* (Costa et al., 2004).

Diversas estratégias moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os genes *apx* têm sido desenvolvidas para detectar, genotipar e caracterizar os diferentes sorotipos de *A.*

pleuropneumoniae (Aalberse et al., 2001; da Costa et al., 2004; Gram et al., 2000; Guo-Sheng et al., 2006; Rayamajhi et al., 2005). Estas técnicas buscam contornar o trabalho laborioso e a necessidade de anticorpos específicos envolvidos em ensaios sorológicos para sorotipar os isolados de *A. pleuropneumoniae* (Rayamajhi et al., 2005). Ainda assim, estas técnicas não são capazes de prever ou contornar a existência de alguns isolados que não podem ser sorotipados por esses métodos. Uma das razões para este problema pode estar relacionada à presença de elementos transponíveis no genoma de *A. pleuropneumoniae*, como o elemento recentemente identificado ISAp11 (Liu et al., 2008). Um trabalho realizado por Tegetmeyer et al. (2008) demonstrou que este elemento previne a detecção sorológica baseada no gene *apxIV* em um isolado de *A. pleuropneumoniae* do sorotipo 7.

A habilidade de discriminar entre cepas de *A. pleuropneumoniae* é muito vantajosa na melhor compreensão da transmissão da doença e monitoramento de isolados virulentos e resistentes a antibióticos (Zhou et al., 2008). Por isso, a sorotipagem e a caracterização de isolados de campo de *A. pleuropneumoniae* são fatores chave no estudo epidemiológico e no controle da doença, porque a prevalência e a virulência dos diferentes sorotipos podem variar entre países e regiões (Dubreuil et al., 2000). No Brasil, um estudo realizado com isolados obtidos em diversas regiões do país entre os anos de 1993 e 2006, revelou que os sorotipos mais prevalentes eram o 5 e 3, seguidos pelos sorotipos 7, 6 e 5 (Kuchiishi et al., 2007).

Atualmente existem três genomas completos sequenciados de *A. pleuropneumoniae*, disponíveis no banco de dados Genbank (NCBI) sob os números de acesso CP000569, CP000687 e CP001091. Os dados obtidos a partir do sequenciamento destes três isolados revelam que *A. pleuropneumoniae* possui um único cromossomo com aproximadamente 2,2 – 2,3 Mb, entre 2012 e 2097 sequências codificadoras putativas, 62 – 63 genes de tRNA e 6 – 7 operons de rRNA (Foote et al., 2008; Xu et al., 2008). As diferenças observadas tanto no tamanho do genoma quanto no número de genes putativos ressaltam a importância da análise de isolados específicos para a melhor compreensão da dinâmica da doença causada por *A. pleuropneumoniae* em uma determinada área.

A análise da presença e distribuição de elementos repetitivos nos genomas de micro-organismos tem provado ser uma ferramenta vantajosa para estudos de isolados microbianos, tanto em pesquisas de ecologia microbiana, microbiologia ambiental, diagnósticos moleculares, microbiologia médica e análises epidemiológicas (Ishii e Sadowsky, 2009). As análises baseadas em reações de PCR para estes elementos (rep-PCR – *Repetitive sequence-based PCR*) tem como alvos regiões variadas do genoma, chamadas de genoma “dispensável” (Turnbaugh et al., 2007). Três destas análises que contemplam sequências repetidas distintas são ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR. Diversos trabalhos demonstram que estas técnicas têm a vantagem de serem simples e possibilitarem a diferenciação de organismos nos níveis de sub-espécies e cepas (Healy et al., 2004; Wise et al., 2007). O conhecimento do poder discriminatório de um método de tipagem é importante para o delineamento experimental de investigações epidemiológicas, sendo ideal que o método combine isolados proximoamente relacionados e distinga isolados não relacionados (Wilson et al., 2009).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi genotipar e determinar a variabilidade genômica de isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtidos em granjas na região sudeste do Brasil, e propor assim, estratégias para a caracterização molecular desta bactéria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Micro-organismos e condições de cultivo*

Neste trabalho foram utilizados 91 isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtidos entre os anos de 2003 e 2010 em nove granjas diferentes da região sudeste do Brasil, sendo a maioria do Estado de Minas Gerais, cujas três principais regiões produtoras são contempladas. As granjas foram nomeadas de A-I e com exceção da granja G, o sistema de criação independente foi prevalente. Todos os isolados, incluindo linhagens referências dos sorotipos 1 a 15, foram cedidos pela empresa MICROVET – Microbiologia Veterinária Especial (Viçosa, Minas Gerais). Os micro-organismos estão listados na Tabela 1 e foram obtidos a partir de pulmões ou abscessos de pulmões de suínos com manifestação clínica de pleuropneumonia, sendo previamente identificados por testes bioquímicos e sorotipados por técnicas imunológicas (imunodifusão) pela própria empresa.

Todos os isolados foram cultivados em meio de infusão de cérebro e coração (BHI – *brain heart infusion*) acrescido de 0,01 % de NAD, por 24 h a 37 °C. Os isolados foram mantidos a -80 °C em BHI contendo 25 % de glicerol.

2.2. *Extração de DNA de A. pleuropneumoniae*

Para a extração do DNA total, foi utilizado o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, EUA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as indicações do fabricante, com modificações. Foi adicionada uma etapa inicial de lavagem dos sedimentos das culturas dos isolados com solução PBS 1X, por duas vezes. A integridade e a concentração do DNA obtido foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e espectrofotometria, respectivamente.

Tabela 1

Isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizados neste trabalho

Origem	Isolados (ano de isolamento)
São Paulo	
Granja A	573 (2006)
Minas Gerais	
Região 1	
Granja F	343, 344, 345, 5237 (2005); 512, 555 (2007)
Região 2	
Granja C	433 (2006)
Granja G	5264 (2008)
Granja I	710 (2008)
Região 3	
Granja B	496, 505 (2007); 653 (2008); 732 (2009)
Granja D	513 (2007)
Granja E	215, 216, 222, 223, 224, 225 (2002); 235, 3174, 3440 (2003); 263, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 284, 294, 297, 3571 (2004); 313 (2005); 368, 370, 384, 407, 408, 5651 (2006); 570, 597, 598 (2008); 712, 713 (2009)
Granja H	010 (1996); 234, 236 (2003); 374, 375, 376, 377, 378, 396, 403, 404, 405, 406, 432, 440, 442, 443 (2006); 452, 497, 470, 471, 473, 484, 485, 486, 487, 492, 540, 541 (2007); 718, 621, 622, 623, 678, 679, 683, 688, 696, 697, 698 (2008), 719, 742, 762, 804, 805, 807, 808, 813, 814, 815, 827, 828, 831 (2009), 836 (2010)
Linhagens referência (sorotipo)	
	CVCC259 (01), 1536 (02), CVCC261 (03), M62 (04), K17 (5a), L20 (5b), FemΦ (06), WF83 (07), 405 (08), 13261 (09), 13039 (10), 56153 (11), 8329 (12), N-273 (13), 3606 (14), HS143 (15)

2.3. Genotipagem dos isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

2.3.1. PCR multiplex

A reação de PCR multiplex dos genes *apx* foi realizada de acordo com Rayamajhi et al (2005), com algumas modificações. A PCR foi realizada em um aparelho termociclador C1000TM *Thermal cycler* (BioRad, Richmond, EUA), utilizando-se os pares de oligonucleotídeos APXIAF/APXIAR, APXIBF/APXIBR, APXIIF/APXIIR, APXIIIF/APXIIIR e APX4DWN-L/APXIV-IR (Tabela 2). A reação foi realizada com 100 ng de DNA, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μM de cada um dos *primers*, 0,8 μg/μL de soro albumina bovina e 1,25 U da enzima Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Os parâmetros da reação de PCR foram desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 54 °C por 45 segundos e extensão do *primer* pela DNA polimerase a 72 °C por 3 minutos. Após o último ciclo a reação foi submetida a 10 minutos a 72 °C, sendo

posteriormente resfriada a 12 °C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídeo. O perfil de fragmentos obtido para os isolados foram comparados com o perfil de fragmentos esperado para os as linhagens referência (Rayamajhi et al., 2005). A especificidade da reação para *A. pleuropneumoniae* foi avaliada realizando-se a PCR-multiplex com isolados de *Haemophilus parasuis* 10005 e 9190, *Pasteurella multocida* 1769, 5869 e 5875 e *Escherichia coli* K12.

Tabela 2
Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência (5'-3')	Acesso no Genbank	Posição	Amplicon (pb)	Fonte	
APXIAF	ATCGAAGTACATCGCTCGGA	X52899	275–295	723	Rayamajhi et al. (2005)	
APXIAR	CGCTAATGCTACGACCGAAC	X52899	968–998			
APXIBF	TTATCGCACTACCGGCACTT	X68595	4102–4121	811		
APXIBR	TGCAGTCACCGATTCCACTA	X68595	4893–4913			
APXIIF	GAAGTATGGCGAGAAGAACG	AY736188	973–993	965		
APXIIR	CGTAACACCAGCAACGATTA	AY736188	1918–1938			
APXIIIF	GCAATCAGTCCATTGGCGTT	X80055	9558–9578	396		
APXIIIR	GACGAGCATCATAGCCATTC	X80055	9934–9954			
APX4DWN-L	GCGAAACAATTCGAAGGG	AF021919	6459–6442	2331		Sthitmatee et al. (2003)
APXIV-IR	GGCCATCGACTCAACCAT	AF021919	4111–4128			
APXIVAF	GCCTCCGACCTGAATAAACCC	AF021919	2923-2942	3525	Jaglic et al. (2004)	
APXIVAR	CAACCATCTTCTCCACC	AF021919	6432-6448			
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	-	-	variável	Versalovic et al. (1991)	
ERIC2	AAGTAAGTGAAGTGGGTGAGCG	-	-			
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	-	-			
GTG ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	-	-			
oTSP1	GCAAATTAGAGCAGCCTGAA	EU155211	306-325	549	Tegetmeyer et al. (2008)	
oTSP2	GGGAAGTAAATTCTACACCCAG	EU155211	832-855			

2.3.2. Análise de restrição do gene *apxIVA* obtido por (PCR-REA)

Com o objetivo de identificar e/ou confirmar os sorotipos de isolados de *A. pleuropneumoniae* não sorotipáveis por imunodifusão e PCR multiplex a técnica de PCR-REA utilizando o amplicon correspondente ao gene *apxIVA* foi utilizada. O gene *apxIVA* dos isolados de sorotipo duvidoso foi amplificado de acordo com Jaglic et al. (2004), com o par de *primers* APXIVAF/APXIVAR (Tabela 2) com as seguintes alterações: 1U da enzima GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, EUA) foi utilizada em uma reação de 50 µL contendo 100 ng de DNA, 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 0,2 µM de cada um dos *primers*. O produto amplificado foi analisado e quantificado por

eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,0 % e 1 µg do produto da PCR foi utilizado para a reação de digestão com endonucleases. Nesta etapa foram selecionadas as enzimas *AluI*, *HhaI* e *HpaI* (BioLabs, Massachusetts, EUA) para clivar os amplicons correspondentes aos genes *apxIV* das cepas referência dos sorotipos cujos resultados apresentaram-se duvidosos. A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O tamanho dos fragmentos de DNA e o perfil de fragmentos gerados para os isolados foram comparados com os perfis de fragmentos obtidos para as linhagens referência.

2.3.3. *Investigação da presença e do número de cópias do elemento transponível ISApI1 nos isolados clínicos de A. pleuropneumoniae*

Para alguns isolados de *A. pleuropneumoniae* as técnicas anteriormente descritas não foram eficientes e na tentativa de avaliar a possível mudança nos perfis de fragmentos obtidos pela técnica de PCR multiplex a busca por sequências de inserção foi feita. O par de *primers* oTSP1/oTSP2 (Tabela 2), desenhado para a amplificação de um fragmento da ORF da transposase da ISApI1 de 526 pb foi utilizado (Tegetmeyer et al., 2008) com o objetivo de se fazer uma triagem por PCR da presença do elemento ISApI1 nos isolados. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %.

A análise do número de cópias do elemento ISApI1 no genoma de alguns isolados foi feita pela técnica de *Southern blotting*. O par de *primers* oTSP1/oTSP2 foi utilizado para a síntese da sonda para a hibridização. A marcação e detecção foi realizada com o kit *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*TM (Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as indicações do fabricante. Um total de 5 µg de DNA extraído dos isolados foi submetido a clivagem por 16 h com as enzimas de restrição *AvaI* e *XbaI* (Promega, Madison, EUA), que não clivam a região da sequência utilizada como sonda, gerando um fragmento esperado de 619 pb. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e transferidos para uma membrana de nylon Amersham HybondTM-N⁺ (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Inglaterra) de acordo com Sambrook et al.

(1989). A hibridização foi realizada em condições de alta estringência a 42 °C como sugerido pelo fabricante e as condições de lavagem foram: 5 min em SSC 2X / SDS 0,1 % e 5 min em SSC 0,5X / SDS 0,1 %, ambas em temperatura ambiente, seguido por 15 min em SSC 0,5X / SDS 0,1 % e 15 min em SSC 0,1X / SDS 0,1 % a 65 °C. Posteriormente, prosseguiu a etapa de revelação de acordo com a sugestão do fabricante. O resultado foi visualizado e capturado com fotodocumentador L-Pix Chemi (Loccus, São Paulo, Brasil).

2.4. Caracterização molecular dos isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR

Os *primers* BOXA1R, (GTG)₅ e o par de *primers* ERIC1R e ERIC2 (Tabela 2) foram utilizados para amplificar sequências repetitivas no genoma dos isolados de *A. pleuropneumoniae*, constituindo respectivamente as técnicas de BOX-PCR, (GTG)₅-PCR e ERIC-PCR. Todas as reações foram feitas no termociclador C1000™ *Thermal cycler* (BioRad, Richmond, EUA). Os parâmetros do ciclo das reações ERIC-PCR e BOX-PCR foram feitos de acordo com Mohapatra et al. (2008).

A reação de ERIC-PCR foi feita para um volume final de 25 µL, contendo 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada um dos *primers*, 0,8 µg/µL de soro albumina bovina (BSA), 100 ng de DNA e 1U da enzima JumpStart™ *Taq* DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido).

As reações de BOX-PCR e (GTG)₅-PCR foram feitas para um volume final de 25 µL, contendo 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2 µM do respectivo primer, 1,0 mg/mL de soro albumina bovina (BSA), 4% de dimetil-sulfóxido (DMSO), 100 ng de DNA e 1U da enzima JumpStart™ *Taq* DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido).

A reação de (GTG)₅-PCR foi feita com uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 38 °C por 75 seg e extensão a 65 °C por 8 min. O passo final constituiu de extensão a 65 °C por 16 min.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 % juntamente com o marcador GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

(Fermentas, Burlington, Canadá). Os padrões de *fingerprinting* obtidos foram analisados por meio do software BioNumerics v 5.0., também utilizado para a construção de dendrogramas pelo método de UPGMA. A reprodutibilidade dos três métodos foi avaliada escolhendo-se aleatoriamente cinco isolados e submetendo-os às reações por no mínimo três reações independentes.

3. RESULTADOS

3.1. Genotipagem dos isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

3.1.1. PCR multiplex das toxinas *apx*

Dentre os isolados estudados neste trabalho, apenas 54 % deles haviam sido eficientemente sorotipados pelas técnicas imunológicas, uma vez que para os demais foram observadas reações cruzadas. Contrastando com estes resultados, a técnica de PCR multiplex gerou perfis de fragmentos que permitiu caracterizar 96 % dos isolados, os demais 4 % apresentaram perfis diferentes daqueles obtidos para as linhagens referência. A comparação entre a sorotipagem imunológica e a genotipagem realizada neste trabalho revelou que 92 % dos resultados são coincidentes (Tabela 3). Estes dados mostram que a técnica de PCR multiplex com os genes *apx* pode ser utilizada eficientemente na caracterização do sorotipo de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae*, frente ao elevado número de isolados não sorotipáveis por técnicas imunológicas.

A especificidade da reação de PCR multiplex também foi investigada utilizando-se DNA de isolados de *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* e *Escherichia coli*. Os perfis inesperados e o não aparecimento do fragmento correspondente ao gene *apxIV* demonstraram que a reação foi específica para *A. pleuropneumoniae* (dados não apresentados). Como o gene *apxIV* é específico para a espécie *Actinobacillus pleuropneumoniae* o aparecimento do fragmento correspondente deste gene não era esperada para os demais isolados (Cho e Chae, 2001).

Para a reação com os isolados de *A. pleuropneumoniae* era esperada a presença de entre 3 e 4 fragmentos, cujos tamanhos variavam entre 396 e

2800 pares de bases. O tamanho do fragmento esperado para o fragmento correspondente ao gene *apxIA* foi de 723 pb, 811 pb para o gene *apxIB*, 965 pb para o gene *apxII*, 396 pb para o gene *apxIII* e 1600, 2000, 2400 ou 2800 para o gene *apxIV*, sendo estes últimos quatro fragmentos de tamanhos diferentes sorotipo-específicos. A figura 1 apresenta o perfil de fragmentos obtido para alguns dos isolados utilizados.

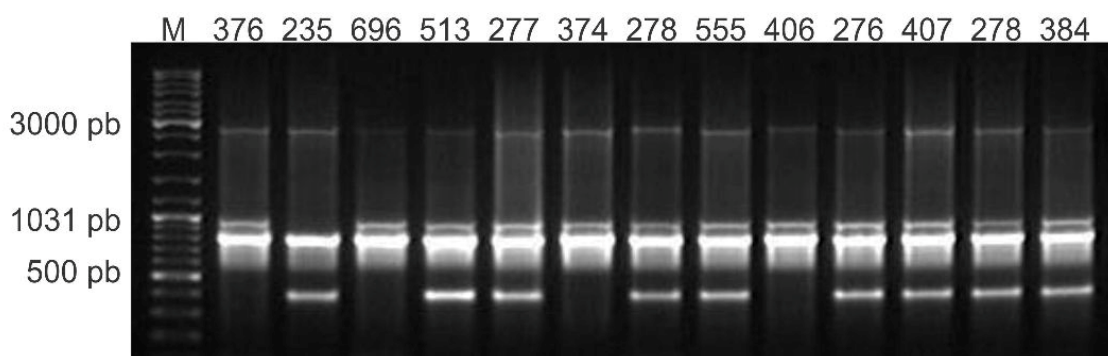


Figura 1. Genotipagem de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por PCR multiplex. Perfil de fragmentos obtido em diferentes isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. M: Marcador GeneRuler® DNA Ladder Mix (Fermentas, Burlington, Canadá).

Os perfis de fragmentos obtidos na reação de PCR multiplex com os genes *apx* dos 91 isolados avaliados neste trabalho foram comparados com os perfis de fragmentos obtidos para referências dos 15 sorotipos. Dentre os isolados genotipados, um foi classificado como do sorotipo 1, cinco como do sorotipo 5, trinta e nove como do sorotipo 7 e quarenta deles foram classificados como sendo dos sorotipos 2, 8 ou 15, uma vez que somente por PCR-multiplex não há possibilidade de discriminação entre esses três (Tabela 3). Adicionalmente, três isolados não sorotipáveis, 235, 497 e 718 continuaram sem sorotipo definido pela técnica de PCR-multiplex, pois, os perfis de fragmentos apresentados por estes não correspondem aos perfis de nenhum dos sorotipos referência. O isolado 452, classificado como pertencente ao sorotipo 7, não se apresentou genotipável pela PCR multiplex, o que reflete a diversidade genética entre os isolados de *A. pleuropneumoniae*.

Apesar do tipo de manejo na criação dos suínos ser do tipo independente tanto na granja E quanto na granja H, locais de predominância da maioria dos isolados, foram identificados isolados de sorotipos diferentes, sendo a maioria deles do sorotipo 7 ou do grupo dos sorotipos 2, 8 ou 15 (reação cruzada). A maioria dos demais isolados das outras regiões também foi classificada dentro de um desses dois grupos de sorotipos, com exceção dos isolados da granja B, que apresentaram um perfil de fragmentos do sorotipo 5.

Como a técnica de PCR multiplex com os genes *apx* não foi eficiente em responder ao problema de reação cruzada entre os sorotipos 2, 8 e 15 e grande parte dos isolados utilizados neste trabalho enquadram-se neste grupo, foi realizada a técnica de PCR-REA.

*3.1.2. Análise de restrição de PCR (PCR-REA) dos isolados de sorotipo duvidoso com o gene *apxIVA**

Considerando-se que tanto os testes sorológicos quanto a genotipagem por PCR multiplex não permitiram a discriminação entre isolados dos sorotipos 2, 8 ou 15 e que 44 % dos isolados genotipados foram classificados neste grupo, a técnica de PCR-REA com o amplicon do gene *apxIVA* foi aplicada para a diferenciação e confirmação dos sorotipos destes isolados. As enzimas *AluI*, *HhaI* e *HpaII*, que reconhecem sequências específicas de quatro pares de bases foram escolhidas para a triagem inicial.

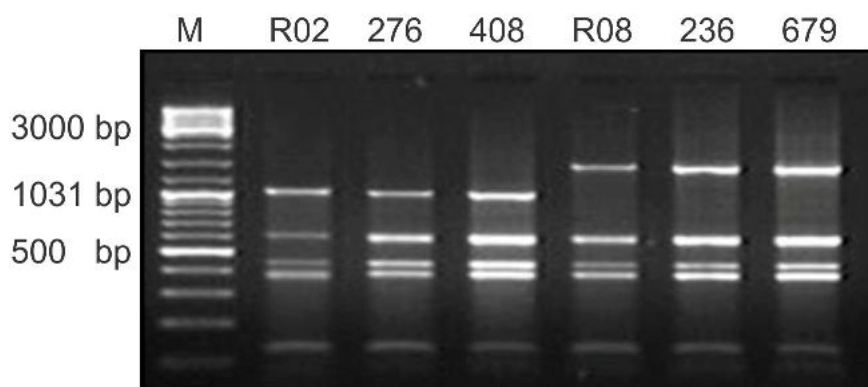


Figura 2. Identificação do sorotipo de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por PCR-REA. Perfil de restrição observado após o tratamento do amplicon do gene *apxIVA* obtido de alguns isolados de *A. pleuropneumoniae* e DNA referência dos sorotipos 2 e 8 (R02 e R08, respectivamente) com a enzima de restrição *HpaII*. M = Marcador GeneRuler® DNA Ladder Mix (Fermentas, Burlington, Canadá).

O perfil de fragmentos de DNA obtido com as três enzimas gerou fragmentos diferentes entre os três sorotipos. Os fragmentos variaram entre 90 e 3410 pb (Material suplementar, Tabela S1). Como as três enzimas mostraram-se eficientes na diferenciação dos sorotipos 2, 8 e 15, a enzima *HpaII* foi aleatoriamente selecionada para as análises de PCR-REA subsequentes.

O emprego da PCR-REA com o gene *apxIVA* permitiu discriminar o sorotipo de 100% dos 40 isolados cujo sorotipo estava duvidoso entre 2, 8 ou 15 (Figura 2). A tabela 3 apresenta a classificação dos isolados com base nos resultados da reação de PCR-REA.

Destes 40 isolados, 42 % são do sorotipo 8 e 58 % são do sorotipo 2. Os dados mostram que apenas isolados da granja E são do sorotipo 2, mesmo que nesta granja também tenham sido encontrados quatro isolados do sorotipo 8: 384, 597, 712 e 5651. Todos os isolados das regiões A, C, D, F, G e H anteriormente classificados como dos sorotipos 2, 8 ou 15, foram identificados como do sorotipo 8.

Tabela 3

Determinação dos sorotipos dos isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizados neste trabalho

Isolados	Sorotipagem	Genotipagem	
		PCR multiplex	PCR-REA
010	1	1	-
284, 294	5	2, 8 ou 15	2
404, 405, 406, 432, 440, 442, 443, 470, 471, 473, 484, 485, 486, 487, 492, 540	7	7	-
452	7	NG	-
263, 275, 276, 277, 278, 279, 297, 313, 368, 370, 407, 408, 3174, 3440, 3571	2, 8 ou 15	2, 8 ou 15	2
343, 344, 345, 384, 433, 5651, 5237, 512, 555, 5264	2, 8 ou 15	2, 8 ou 15	8
234	2, 8 ou 15	7	-
505	2, 8 ou 15	5	-
215, 216, 222, 223, 224, 225	ND	2, 8 ou 15	2
513, 573, 597, 598, 712	ND	2, 8 ou 15	8
374, 375, 376, 377, 378, 396, 403, 540, 541, 621, 622, 623, 678, 679, 683, 688, 696, 696, 697, 698, 710, 713, 719, 742, 762, 804, 805, 807, 808, 813, 814, 815, 827, 828, 831, 836	ND	7	-
496, 570, 653, 732,	ND	5	-
235, 497, 718	ND	NG	-

ND: sorotipo não determinado, devido à ocorrência de reações cruzadas, NG: isolado não genotipável pela técnica molecular, - : não aplicável.

3.1.3. Investigação da presença do elemento transponível IS*Apl1* nos isolados de *A. pleuropneumoniae*

Embora a maioria dos isolados tenha sido eficientemente caracterizados pelas reações de PCR multiplex e PCR-REA, quatro deles apresentaram perfis de fragmentos diferentes daqueles obtidos para as linhagens referência, o que impossibilitou a identificação de seus sorotipos. Um estudo anterior identificou a existência de um elemento transponível, denominado IS*Apl1*, relacionado ao impedimento da detecção sorológica de *A. pleuropneumoniae* baseada no gene *apxIVA* (Tegetmeyer et al., 2008). Neste contexto, foi feita uma triagem dos isolados para a presença do elemento IS*Apl1* por PCR com o par de primers oTSP1 e oTSP2 (Tabela 2). Nesta triagem, 41% dos 91 isolados

utilizados neste estudo apresentaram resultado positivo para a presença da transposase (Figura 4). Os produtos de PCR de três isolados escolhidos aleatoriamente dentre os que apresentaram resultado positivo foram purificados e sequenciados. A identidade dos fragmentos foi comprovada após a busca por homologia no banco de dados Genbank através da ferramenta Blastn. O fragmento amplificado e sequenciado é idêntico à sequência da transposase de ISAp1 depositado com número de acesso EF407820, contemplando a região entre os pontos 342 a 856.

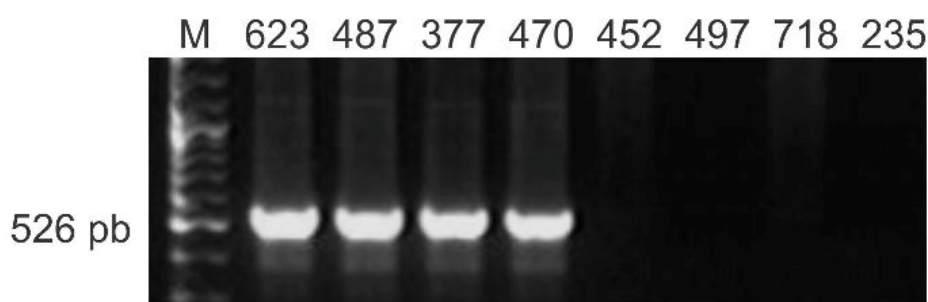


Figura 3. PCR para a ORF da transposase da sequência de inserção ISAp1. Investigação feita em diferentes isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, genotipáveis e não genotipáveis por PCR multiplex com os genes *apx*. M = Marcador GeneRuler® DNA Ladder Mix (Fermentas, Burlington, Canadá)

O número de cópias do elemento ISAp1 foi avaliado por *Southern blotting* em alguns isolados de *A. pleuropneumoniae*, incluindo os quatro que não puderam ser genotipados pela técnica de PCR multiplex para os genes *apx*. Estes quatro isolados não apresentaram nenhum produto amplificado utilizando-se o par de *primers* oTSP1/oTSP2, o que nos levou a acreditar na inexistência do elemento ISAp1 em seus respectivos genomas (Figura 4).

Surpreendentemente, mesmo que o fragmento de DNA esperado de 619 pb pela clivagem com as enzimas *AvaI* e *XbaI* não tenha aparecido na reação de *Southern blotting* destes quatro isolados, todos eles hibridizaram com a sonda para a ORF da transposase em diferentes números de fragmentos e posições (Figura 4). Nos isolados genotipáveis, em que o fragmento do ISAp1 foi visualizada pela PCR, além do fragmento de 619 pb esperado, pelo menos 10 outros fragmentos foram observados, o que permite inferir que a sequência de inserção está presente em um grande número de cópias no genoma de *A. pleuropneumoniae* isolado em nossa região de estudo.

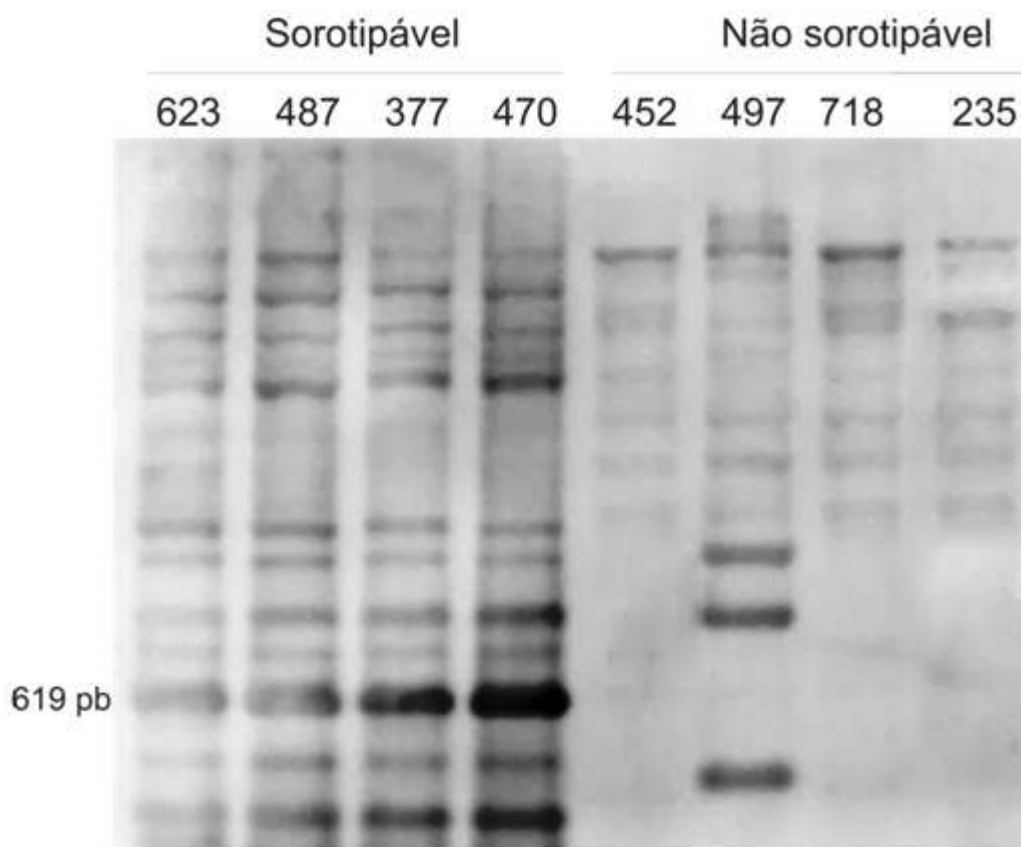


Figura 4. Presença da sequência de inserção ISAp1 no genoma de isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Foram avaliados isolados com resultados positivos para a PCR com o par de *primers* oTSP1/oTSP2 e isolados não genotipáveis pela reação de PCR multiplex com os genes *apx*. Em destaque, o fragmento de 619 pb esperado com a clivagem do DNA total pelas endonucleases *Ava*I e *Xba*I.

3.4. Caracterização dos isolados de *A. pleuropneumoniae* por *fingerprinting* utilizando as técnicas de ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR

A diversidade genética dos isolados clínicos obtidos na região considerada neste trabalho foi analisada por meio de PCR de regiões repetitivas (rep-PCR). Neste sentido, foram utilizados três métodos: ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR.

Os três métodos apresentaram complexidades aproximadas, ainda que os perfis de *fingerprinting* tenham sido diferenciados. Os fragmentos variaram de tamanho de 200 pb a 5 kb ou mais, sendo que ERIC-PCR resultou em 12 a 28 fragmentos no gel de agarose, BOX-PCR apresentou entre 19 e 22 e (GTG)₅-

PCR entre 15 a 20 fragmentos (Figura S1). Nas condições padronizadas, os três métodos utilizados mostraram-se reprodutíveis.

A reação de BOX-PCR ainda apresentou um forte fragmento de aproximadamente 1,2 kb na maioria dos isolados de *A. pleuropneumoniae* (Figuras S1B e 8), sendo que a mesma não foi observada em nenhum dos micro-organismos utilizados como controle negativo, *Haemophilus parasuis* 10005 e 9190, *Pasteurella multocida* 1769, 5869 e 5875 e *Escherichia coli* K12

Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA. Os dendrogramas resultantes para as reações de ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR são apresentados, respectivamente, nas figuras 5, 6 e 7. As três técnicas mostram que mesmo em se tratando de isolados bacterianos da mesma espécie e mesmo nicho, existe uma grande variabilidade genética entre os isolados de *A. pleuropneumoniae* no sudeste do Brasil, baseado no número de ramos gerados.

Muitos isolados com características em comum – sejam o sorotipo, o ano ou a região de isolamento – foram agrupados no mesmo ramo ou adjacientemente. Os grupos formados estão destacados nas figuras 5 a 7. O perfil de agrupamento da reação de ERIC-PCR reuniu diversos isolados da granja H e do sorotipo 7 (Figura 5), independente do ano de isolamento, o que sugere a ocorrência de um surto de difícil controle. Estes dados evidenciam que nesta granja não houve muita alteração do perfil genético dos isolados de *A. pleuropneumoniae* ao longo dos anos. Apesar disso, existem alguns isolados da mesma granja e do mesmo sorotipo com agrupamento discrepante. Alguns isolados do sorotipo 8 também se agruparam independentemente da granja de isolamento (Figura 5), mostrando que granjas diferentes possuem animais portadores de micro-organismos muito semelhantes. Os isolados obtidos no ano de 2004 na granja E do sorotipo 2 também foram agrupados. O fato destes isolados não terem se agrupado com outros pode denotar a erradicação dos mesmos pelos métodos de controle adotados na área.

O perfil de agrupamento da reação de BOX-PCR contrapõe em parte algumas das informações e endossa outras (Figura 6). Neste caso, aqueles

isolados que anteriormente haviam se agrupado com as características em comum de serem do sorotipo 7 e da granja H são mostrados separados de acordo com os anos de isolamento (2007 e 2009). Ainda assim, a proximidade dos dois ramos demonstra que os isolados não são tão semelhantes como sugerido pela reação de ERIC-PCR (Figura 5), as diferenças não são tão significativas. Assim como observado na Figura 5, pela técnica de BOX-PCR, alguns isolados do sorotipo 8 também se agruparam independentemente da granja de isolamento (Figura 6), o que reforça a informação de que granjas de diferentes regiões possuem animais portadores de micro-organismos similares. Os isolados obtidos no ano de 2004 na granja E do sorotipo 2, assim como observado no dendrograma de ERIC-PCR, também foram agrupados no dendrograma de BOX-PCR. Outros agrupamentos mostram que, enquanto os isolados de 2004 podem ter sido erradicados, outros muito semelhantes aparecem em outras regiões e novos isolados da granja E emergiram em outros anos.

Os dados obtidos com o dendrograma gerado por (GTG)₅-PCR mostraram um perfil um pouco diferente dos dois discutidos anteriormente (Figura 7). Neste, nenhum dos isolados do sorotipo 8 se agruparam. Isolados do sorotipo 2 da granja E agruparam-se independente do ano e vários isolados do sorotipo 7 se agruparam independente do ano ou granja de isolamento. Entretanto, os isolados do sorotipo 7 obtidos em 2007 da granja H mantiveram-se agrupados, juntamente com alguns isolados obtidos em outros anos.

Fazendo-se uma comparação entre os dendrogramas obtidos pelas três técnicas de rep-PCR, o obtido pela técnica de BOX-PCR é o que apresentou maior regularidade no agrupamento dos isolados de *A. pleuropneumoniae*, ou seja, maior número de isolados com características em comum foram agrupados. Nas três técnicas, muitos dos isolados do sorotipo 8 não se agruparam com regularidade, o que mostra que, ainda que existam aqueles muito semelhantes entre si, mesmo que em regiões diferentes, existem muitos isolados discrepantes.

Alguns dos resultados apresentados pelas três técnicas são complementares, por exemplo: enquanto pelas técnicas de ERIC-PCR e (GTG)₅-PCR os isolados denominados 808 e 828 apresentem um perfil idêntico, pelo BOX-PCR estes, embora continuem muito próximos, apresentam pequenas diferenças. Dois isolados não genotipáveis, 235 e 452 agruparam-se, respectivamente, com isolados dos sorotipos 2 e 7 nos três dendrogramas de rep-PCR (destacados com um asterisco nas Figuras 5 a 7), o que mostra que estas técnicas permitem inferir sobre os sorotipos de alguns isolados não caracterizados por outras metodologias.

O genoma dos quinze isolados utilizados como referência é aparentemente muito diferente do genoma dos micro-organismos isolados em Minas Gerais, uma vez que há a tendência dos primeiros se agruparem, mesmo sendo de sorotipos diferentes, nas três técnicas. Estes dados mostram que o tipo de análise feita neste estudo é mais informativo quando isolados de mesma origem clínica são utilizados.

Tanto as técnicas de BOX-PCR quanto de (GTG)₅-PCR conseguiram agrupar os micro-organismos utilizados como controle negativo separadamente dos isolados de *A. pleuropneumoniae*, o que comprova que a técnica pode diferenciar entre estas espécies. Os perfis de fragmento obtido para a *Escherichia coli* K12 não permitiram separá-la dos demais isolados, mesmo que em todos os casos a distância do agrupamento deste micro-organismo com os outros tenha sido grande. Esta informação reforça a importância do uso de micro-organismos de mesma origem clínica para a realização de estudos comparativos.

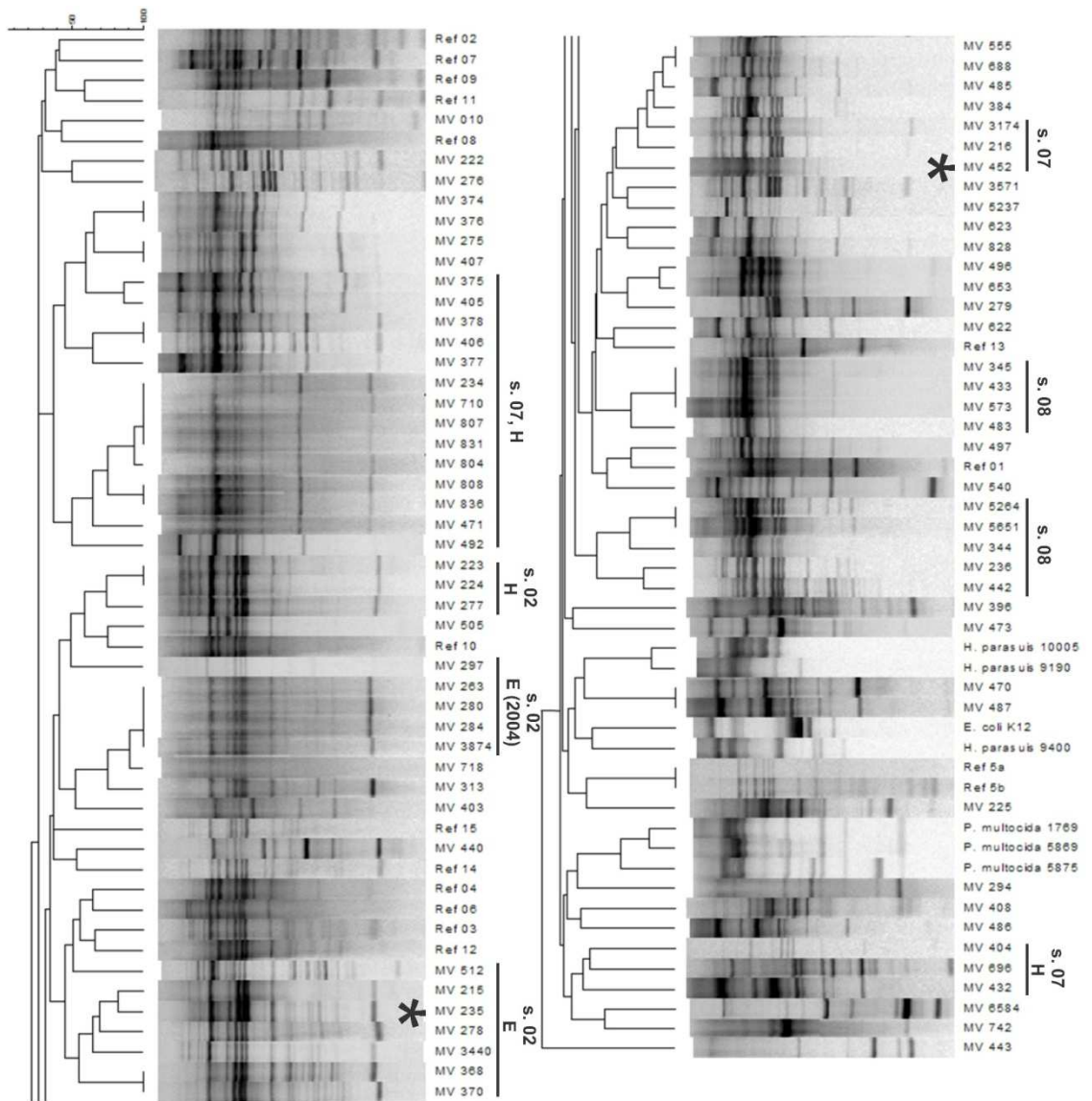


Figura 5. Análise da diversidade genética de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por ERIC-PCR. Dendrograma construído com o programa Bionumerics®. Na figura são destacados apenas agrupamentos de micro-organismos que tenham características em comum, sejam estas os sorotipos, granja e ou ano de isolamento em comum. S: Sorotipo.

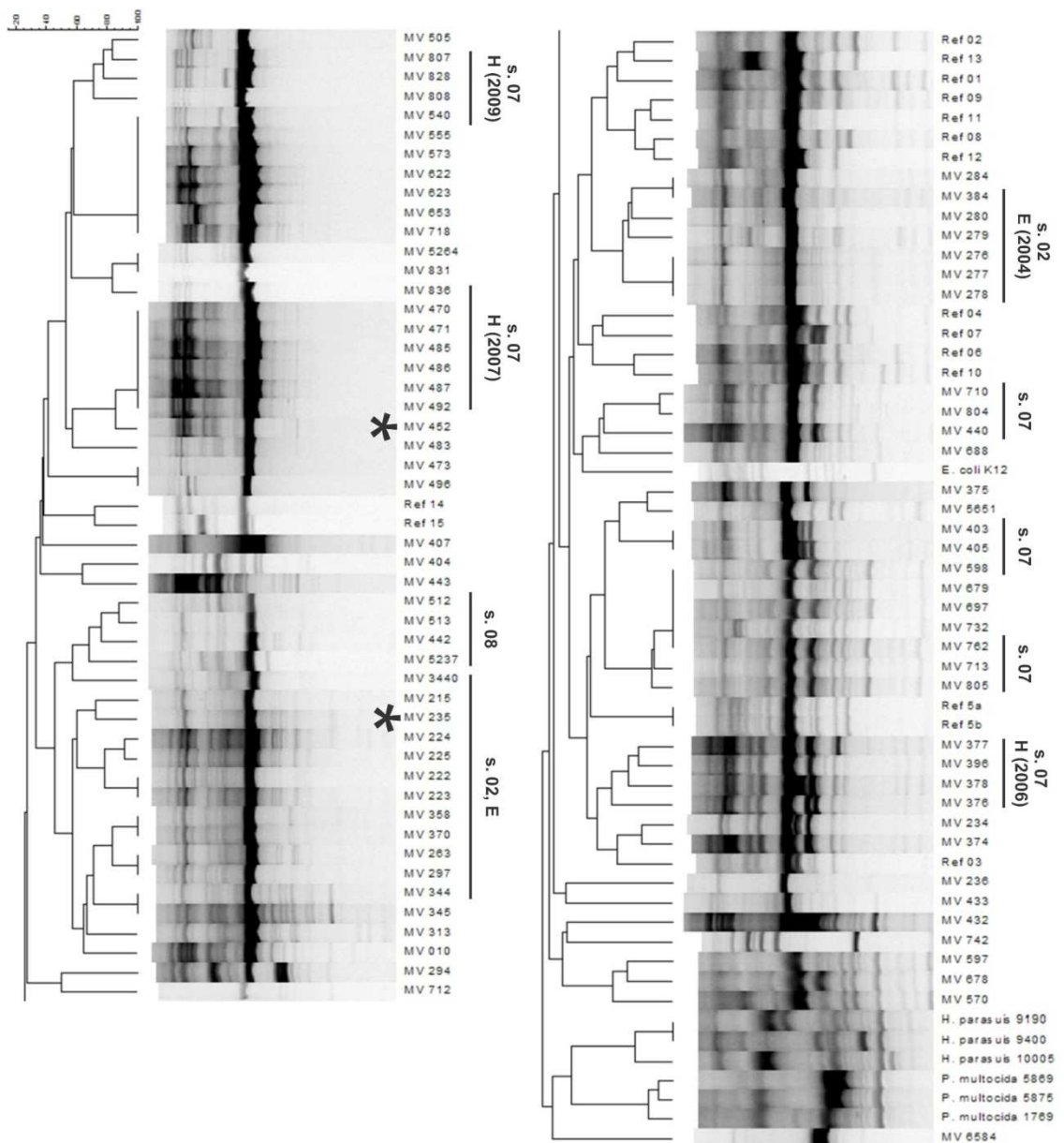


Figura 6. Análise da diversidade genética de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por BOX-PCR. Dendrograma construído com o programa Bionumerics®. Na figura são destacados apenas agrupamentos de micro-organismos que tenham características em comum, sejam estas os sorotipos, granja e ou ano de isolamento em comum. S: Sorotipo.

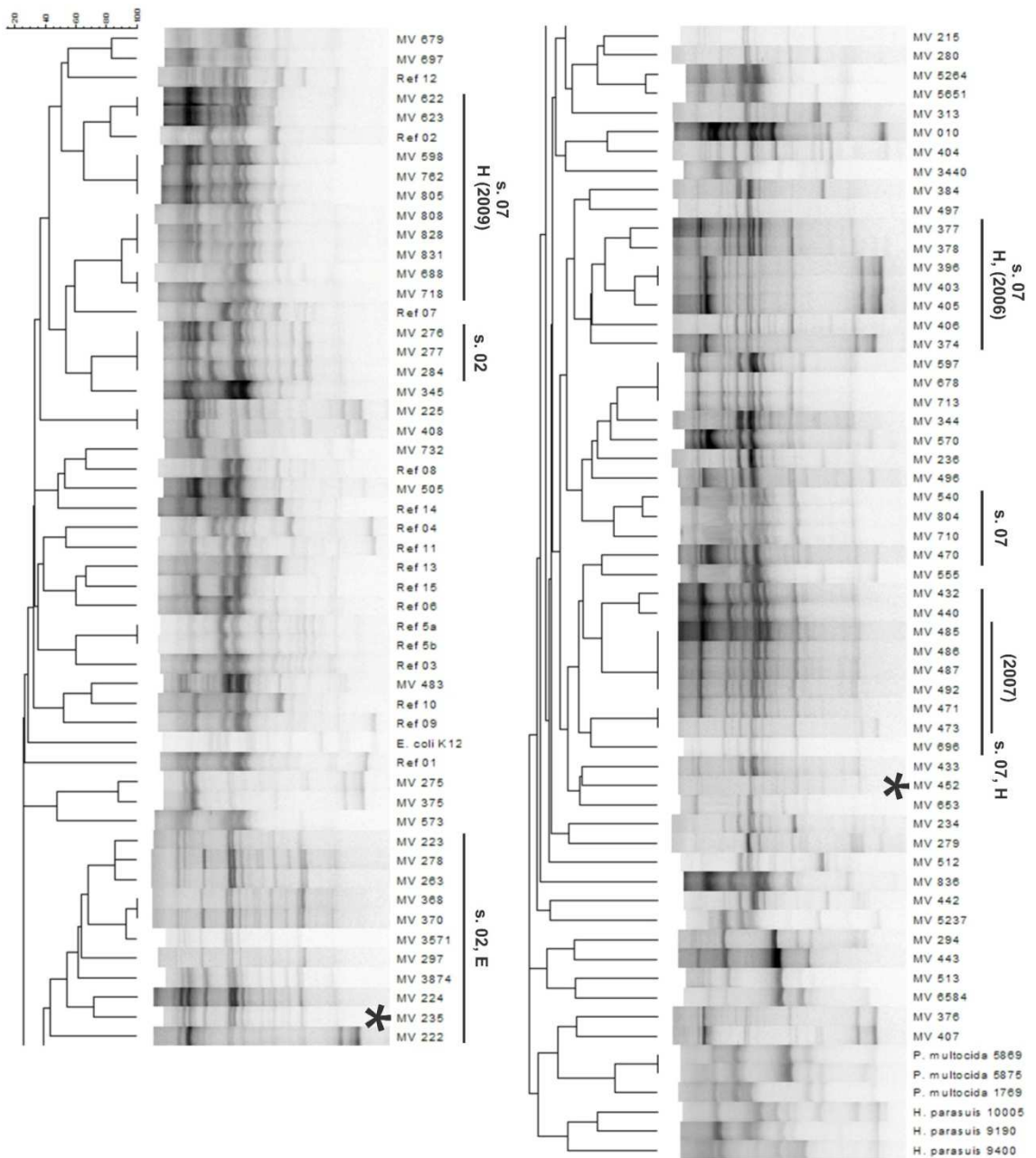


Figura 7. Análise da diversidade genética de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por $(GTG)_5$ -PCR. Dendrograma construído com o programa Bionumerics®. Na figura são destacados apenas agrupamentos de micro-organismos que tenham características em comum, sejam estas os sorotipos, granja e ou ano de isolamento em comum. S: Sorotipo.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta uma compilação de técnicas recentemente desenvolvidas e outras inéditas importantes na caracterização de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Rayamajhi et al. (2005) desenvolveram uma reação de PCR multiplex para a determinação da maioria dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. Os primers desenvolvidos pelo grupo para a reação foram construídos de modo a amplificar os genes das toxinas Apx em uma tal combinação que correspondesse ao o perfil genotípico e fenotípico do gene da toxina em *A. pleuropneumoniae*, que é específico para cada sorotipo ou biótipo.

Os genes *apx* são encontrados em outras espécies além de *A. pleuropneumoniae*. Um trabalho realizado por Schaller et al. (2000) analisou a presença de genes análogos aos genes *apx* de *A. pleuropneumoniae* em espécies da família Pasteurellaceae de origem suína. Diferentes grupos de genes foram encontrados nas espécies *Actinobacillus suis* e *Actinobacillus rossii*. Outras espécies relacionadas, como *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus equuli*, *Pasteurella aerogenes*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* foram comprovadamente consideradas desprovidas de genes *apx*. Contudo, foram observadas reações cruzadas entre anticorpos anti-ApxI, II, e III e proteínas produzidas por *A. equuli*, *A. seminis* and *P. aerogenes*.

Apesar da existência de genes *apx* ou homólogos em outras espécies diferentes de *A. pleuropneumoniae*, a exclusividade do gene *apxIV* (Schaller et al., 1999) garante a especificidade da reação de PCR multiplex desenvolvida por Rayamajhi et al. (2005) utilizada neste estudo. O presente trabalho validou a aplicabilidade desta reação de PCR multiplex, expandindo o seu uso no estudo de isolados clínicos e evidenciou a possibilidade de se caracterizar isolados não sorotipáveis ou não genotipáveis, que apresentam resultados diferentes do esperado quando comparados com as linhagens referência. Em nosso estudo, a taxa de coincidência entre os resultados de sorotipagem e genotipagem foi de 92 %. Este valor é satisfatoriamente alto, principalmente se o compararmos com outros trabalhos que confrontaram resultados de técnicas de sorotipagem com técnicas de genotipagem. Uma pesquisa realizada por

Radtke et al. (2009), por exemplo, comparou sorotipagem e genotipagem de proteínas de superfície em isolados Australianos de *Streptococcus* do grupo B. Os resultados dos dois métodos foram coincidentes em 73,8 % dos isolados. Outro trabalho, realizado por Zekri et al. (2001), confrontou a sorotipagem e a genotipagem de amostras do vírus da hepatite C. Os resultados obtidos apresentaram uma coincidência de 73,3 %. Nossos dados não apenas corroboram com a técnica desenvolvida por Rayamajhi et al. (2005), como sugerem a variabilidade existente no genoma dos isolados de *A. pleuropneumoniae* estudados neste trabalho, uma vez que grande parte dos isolados genotipados são não sorotipáveis por métodos imunológicos e existem isolados não genotipáveis e alguns dados não coincidentes de sorotipagem e genotipagem, o que foi confirmado e reforçado com os resultados de rep-PCR.

A técnica de genotipagem por PCR-multiplex, contudo, é limitada pelo grande número de sorotipos descritos, uma vez que a reação não permite a diferenciação de todos os 15. Ainda assim, esta técnica é encorajada por ser relativamente barata e simples, o que a torna um interessante ponto de partida na análise de uma população desconhecida de isolados de *A. pleuropneumoniae*. Considerando-se que a maioria dos isolados obtidos na região de estudo deste trabalho foi classificada como sorotipos 2, 8 ou 15, um artifício molecular complementar fez-se necessário. Nosso grupo optou pela reação de análise de restrição de PCR (PCR-REA) com o gene *apxIVA*. Nossos resultados demonstram que a técnica de PCR-REA com o gene *apxIVA* pode ser utilizada com sucesso para analisar isolados da nossa região e diferenciar os sorotipos 2, 8 e 15 e confirmou que a maioria dos isolados de *A. pleuropneumoniae* utilizados neste estudo são dos sorotipos 2, 7 e 8. A técnica foi introduzida por Jaglic et al. (2004), que propôs uma análise do perfil de restrição do amplicon do gene *apxIVA* como um método alternativo na sorotipagem de 12 sorotipos referência de *A. pleuropneumoniae*. A possibilidade de diferenciar os sorotipos pela PCR-REA deste gene foi confirmada e testada em isolados de campo que apresentaram reação cruzada com antisoro para sorotipos 1, 9 e 11. Posteriormente, um trabalho realizado por Turni e Blackall (2007) estendeu o estudo aos 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e a 40 isolados de campo da Austrália. Os resultados

reforçaram a técnica e a aplicabilidade desta na análise de isolados australianos.

O sorotipos encontrados em nossa região de estudo contrastam com o levantamento feito por Piffer et al. (1997), em que os sorotipos 3 e 5 foram apontados como dominantes no Brasil, onde também foram encontrados com frequência os sorotipos 1, 4, 7 e 9. Um trabalho mais recente, realizado por Kuchiishi et al. (2007) avaliou a prevalência dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* no Brasil utilizando-se amostras isoladas em diversas regiões do país no período entre os anos de 1993 e 2006. Os resultados, obtidos pela técnica de imunodifusão em gel de agarose, apontaram que os sorotipos mais prevalentes foram 5 (14,8%), 3 (13,8%), 10 (7,3%), 6 (6,5%) e 7 (5%), sendo que aproximadamente 43 % das amostras não puderam ser sorotipadas adequadamente pelo método empregado.

Ao contrário do esperado, dentre os isolados estudados, houve diferenças observadas na distribuição dos sorotipos e nos dados de epidemiologia levantados por Kuchiishi et al. (2007). Todos os micro-organismos isolados entre 2003 e 2010 em nossa região de estudo são dos sorotipos 2, 8, 5 ou 7, sendo o sorotipo 2 característico da granja E, o sorotipo 7 encontrado principalmente nas granjas H e I, o sorotipo 5 exclusivo da granja B e o sorotipo 8 presente em quase todas as granjas. A presença de um determinado sorotipo em maior quantidade em uma determinada granja é provavelmente uma consequência da criação independente adotada na maioria das granjas do sudeste do Brasil, sistema este que diminui as chances de contaminação do animal por agentes externos. A presença de outros sorotipos em menor quantidade revela, contudo, que este tipo de contaminação não é completamente evitado ou que existem isolados persistentes na área.

A discriminação entre todos os 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* por métodos moleculares utilizando-se diferentes genes e estratégias é objetivo de diversos estudos (da Costa et al., 2004; Gram et al., 2000; Rayamajhi et al., 2005; Sthitmatee et al., 2003). Apesar dos esforços, o elevado número de sorotipos e as semelhanças entre eles impedem que o uso destes métodos leve a informações conclusivas quanto ao sorotipo de todos os isolados. O

presente trabalho faz uso de dois destes métodos e apresenta assim, uma estratégia para a melhor caracterização dos sorotipos de isolados de *A. pleuropneumoniae* de uma determinada área.

Ainda que as técnicas utilizadas tenham permitido o melhor entendimento da dinâmica da pleuropneumonia na região de estudo, pouco se pode inferir quanto à variabilidade genética dos isolados, uma vez que apenas alguns dos genes *apx* foram avaliados. Neste contexto, nosso grupo decidiu pesquisar a aplicabilidade de três tipos diferentes de rep-PCR e avaliar o uso destas técnicas na caracterização de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae*. O conhecimento do poder discriminativo de um determinado método de tipagem é muito útil em estudos epidemiológicos e na caracterização mais acurada de uma população microbiana (Wilson et al., 2009).

Os métodos escolhidos, ERIC-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR, são comumente utilizados para a tipagem de diversos tipos de micro-organismos (Adiguzel et al., 2009; Mohapatra e Mazumder, 2008; Redondo et al., 2009). Os *primers* ERIC1R e ERIC2 têm como alvo sequências consenso intergênicas repetitivas em enterobactérias (ERIC) de 124-127 pares de base. O *primer* BOXA1R é um dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de BOX-PCR, que visam à amplificação das sequências Box, que são elementos repetitivos presentes em diversos genomas bacterianos (Versalovic et al., 1991). Os politrinucleotídeos, como (GTG)₅ e (GCC)₅ são altamente repetitivos nos genomas de diversos micro-organismos, representando também sequências repetitivas intercaladas, o que as torna interessantes em estudos de diversidade genética (Versalovic e Lupski, 1998).

De acordo com o que tem sido observado com outros trabalhos, esperávamos que o *primer* (GTG)₅ geraria um maior número de fragmentos e, conseqüentemente, um perfil de *fingerprinting* mais complexo e com maior capacidade para discriminar os isolados de *A. pleuropneumoniae*. Em alguns trabalhos anteriores a complexidade da (GTG)₅-PCR foi superior à de outras técnicas de rep-PCR e proporcionaram melhor discriminação de isolados de outros micro-organismos (Mohapatra e Mazumder, 2008; Svec et al., 2005). Nossos dados mostram que a técnica apresentou um menor número de

fragmentos, quando comparada com os resultados de ERIC-PCR e BOX-PCR, ainda que também tenha permitido caracterizar os isolados, apesar de agrupar um menor número deles com base em características em comum (Figura 7). Entretanto, como observado por Rychlik e Bejckova (1994), o número de fragmentos resultantes varia consideravelmente de uma espécie para outra e está fortemente correlacionado com o conteúdo GC de espécies bacterianas individuais, uma vez que *A. pleuropneumoniae* apresenta um conteúdo GC entre 41,2 % e 41,3 %. Este motivo, juntamente com o fato de *A. pleuropneumoniae* possuir um genoma relativamente pequeno quando comparado a diversos micro-organismos analisados pela técnica pode justificar os resultados obtidos neste trabalho. A saber, os genomas sequenciados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* têm entre 2,2 e 2,3 Mpb (Foote et al., 2008; Xu et al., 2008).

Mesmo que as análises de *fingerprinting* tenham se mostrado hábeis para caracterizar os isolados bacterianos deste estudo, a reação de BOX-PCR, como citado anteriormente, permitiu o melhor agrupamento de isolados com características em comum. Adicionalmente, um fragmento de aproximadamente 1,2 kb foi observada em 93 % dos isolados de *A. pleuropneumoniae*, incluindo as linhagens utilizadas como referência; podendo consistir assim, em um importante marcador molecular na identificação da espécie.

As diferenças observadas nos três dendrogramas apontam para a complementariedade das três técnicas, o que já foi anteriormente discutido em outros estudos. Zhu et al. (2006), por exemplo, analisaram como complementares resultados de *fingerprinting* gerados no estudo de micro-organismos relacionados à degradação da cerveja. A mesma observação levou Wilson et al. (2009) a construir uma análise de *fingerprinting* composto, unindo os resultados obtidos por ERIC e BOX-PCR com o intuito de melhor estudarem as diferenças entre isolados de *Campylobacter jejuni*.

Independente das informações que podem ser obtidas avaliando-se juntamente os três dendrogramas gerados, muitas informações são apenas reforçadas, como o fato de granjas diferentes possuírem micro-organismos

muito semelhantes, sendo estes agrupados tendo em comum a característica de serem do mesmo sorotipo. Isto sugere que a estratégia de controle da doença pode ser a mesma nestas áreas com incidência de isolados similares. Uma vez que os dendrogramas gerados por rep-PCR revelam existência de alguns isolados idênticos e outros muito semelhantes entre si, os dados obtidos são úteis na escolha de isolados representativos para estudos posteriores. A informação gerada mais evidente, todavia, consiste no fato de os isolados estudados apresentarem uma grande variabilidade genética, muitas vezes estando estes na mesma área.

Elementos transponíveis são fontes de extensivas variações genômicas (Gabriel et al., 2006). IS*Apl1*, identificado por Tegetmeyer et al. (2008), é um destes elementos observado em *A. pleuropneumoniae* e classificado como uma sequência de inserção (IS). Esta IS tem um tamanho aproximado de 1070 pares de base e é flanqueada por regiões repetidas invertidas (IR) de 27 pares de base. O elemento contém uma ORF de 924 pares de base que codifica uma transposase. Liu et al. (2008) identificaram ainda uma segunda ORF putativa de 165 pares de base contida inteiramente dentro da ORF da transposase. Acredita-se que esta segunda ORF funcione como um controle antisense ao reduzir a tradução do mRNA da transposase. O elemento IS*Apl1* compartilha características em comum com os elementos da família IS30 (Liu et al., 2008). A classificação de uma IS em uma determinada família é baseada na existência de transposases relacionadas, conservação de sítios catalíticos e organização e IR similares (Siguier et al., 2006a).

Este trabalho revelou que existem diversas cópias da sequência de inserção IS*Apl1* no genoma de *A. pleuropneumoniae*, mesmo naqueles isolados em que o produto de PCR não foi visualizado. Possivelmente, o resultado positivo não foi obtido nestes casos provavelmente devido mutações pontuais presentes nas regiões de anelamento dos primers e também pela existência de cópias incompletas destas ISs no genoma de *A. pleuropneumoniae*. Touchon et al. (2007) observaram que cepas que carregam um tipo de IS tendem a conter outros tipos, sendo que alguns isolados podem apresentar um grande número de IS e também significativa diversidade de

famílias de sequências de inserção. É possível, portanto, que os isolados de *A. pleuropneumoniae* contenham outras IS que também hibridizem com a sonda para ORF da transposase de IS*Apl1*, uma vez que transposases de uma mesma família tendem a ser similares (Siguier et al., 2006a). A bactéria Gram-negativa *Yersinia pestis*, causadora da chamada peste negra é um exemplo de micro-organismo que contém uma grande diversidade de IS em seu genoma. Quando o genoma desta bactéria foi sequenciado, Parkhill et al. (2001) identificaram pelo menos quatro tipos de sequências de inserção no genoma, sendo 66 cópias completas ou parciais do elemento IS1541, 44 da IS100, 21 da IS285 e 9 da IS1661. Acreditamos, por conseguinte, que o grande número de fragmentos observadas por *Southern blotting* reflita também rearranjos que possam ter ocorrido com a transposição de IS*Apl1*, o que também explica a grande variabilidade genética observada nos isolados de *A. pleuropneumoniae* estudados nesta pesquisa. O banco de dados ISFinder (Siguier et al., 2006b) foi utilizado para que se fosse feita uma busca pela distribuição da sequência de inserção IS*Apl1* nos genomas sequenciados das três cepas de *A. pleuropneumoniae* disponíveis no banco de dados Genbank. A tabela S2 apresenta os resultados, que contemplam as localizações dos elementos nos respectivos genomas. Foram encontradas entre sete e nove cópias inteiras das ISs distribuídas nos genomas. Os dados apresentados compreendem apenas as regiões em que o elemento completo foi encontrado, já que existem diversas outras regiões de homologia com regiões incompletas. Estas regiões podem ser derivadas de rearranjos do elemento e reforçam o grande número de bandas encontrado por *Southern blotting* nos isolados analisados neste trabalho.

Em conclusão, este trabalho demonstra a utilização de técnicas moleculares que permitem a caracterização dos sorotipos de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* e apresenta o uso de metodologias inéditas no estudo deste micro-organismo que evidenciam a grande variabilidade genética de seus isolados. Estes estudos representam um importante avanço na compreensão da dinâmica da pleuropneumonia e impulsionam novas pesquisas. A melhor compreensão da atividade do elemento IS*Apl1* e a caracterização dos isolados não sorotipáveis, possivelmente envolvidos na persistência da doença nas

granjas de nossa região, constituem objetos de estudos futuros por nosso grupo de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à empresa MICROVET pelo apoio e gentileza ao fornecer os isolados bacterianos de *A. pleuropneumoniae* utilizados neste estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalberse, R.C., Akkerdaas, J., van Ree, R., 2001, Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 56, 478-490.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F., 2009, Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J Microbiol Methods* 79, 321-328.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L., van den Bosch, H., Kuhnert, P., Frey, J., 2002, Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* 84, 47-52.
- Chien, M.S., Chan, Y.Y., Chen, Z.W., Wu, C.M., Liao, J.W., Chen, T.H., Lee, W.C., Yeh, K.S., Hsuan, S.L., 2009, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived Apxl induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* 135, 327-333.
- Cho, W.S., Chae, C., 2001, Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Comp Pathol* 125, 34-40.
- Costa, M.M., Klein, C.S., Collares, R.M., Vaz, C.S.L., Balestrin, R., Schrank, A., Silva, S.C., Piffer, I.A., Shrank, I.S., 2004, Phenotypic, genotypic and diagnostic aspects of the bacterium *A. pleuropneumoniae*. *Ciência Rural* 34, 1305 - 1313.
- da Costa, M.M., Klein, C.S., Balestrin, R., Schrank, A., Piffer, I.A., da Silva, S.C., Schrank, I.S., 2004, Evaluation of PCR based on gene apxIVA associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Curr Microbiol* 48, 189-195.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., Gottschalk, M., 2000, *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 1, 73 - 93.
- Foote, S.J., Bosse, J.T., Bouevitch, A.B., Langford, P.R., Young, N.M., Nash, J.H., 2008, The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b). *J Bacteriol* 190, 1495-1496.
- Frey, J., 1995, Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* 3, 257-261.

- Gabriel, A., Dapprich, J., Kunkel, M., Gresham, D., Pratt, S.C., Dunham, M.J., 2006, Global mapping of transposon location. *PLoS Genet* 2, e212.
- Gram, T., Ahrens, P., Andreasen, M., Nielsen, J.P., 2000, An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omIA* genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol* 75, 43-57.
- Guo-Sheng, X.I.A.O., San-Jie, C.A.O., Li-li, D.U.A.N., Xin-tian, W.E.N., Xiao-Ping, M.A., Hua-mei, C.H.E.N., 2006, Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by multiplex PCR based on the genes *ApXIVA* and *OmlA*. *Agricultural Sciences in China* 5, 146 - 154.
- Healy, M., Reece, K., Walton, D., Huong, J., Shah, K., Kontoyiannis, D.P., 2004, Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 42, 4016-4024.
- Ishii, S., Sadowsky, M.J., 2009, Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol* 11, 733-740.
- Jaglic, Z., Svastova, P., Rychlik, I., Nedbalcova, K., Kucerova, Z., Pavlik, I., Bartos, M., 2004, Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR-REA based on sequence variability of the *apxIVA* gene and ribotyping. *Vet Microbiol* 103, 63-69.
- Kuchiishi, S.S., Kich, J.D., Ramenzoni, M.L.F., Spricigo, D., Klein, C.S., Fávero, M.B.B., Piffer, I.A., 2007, Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Brazil from 1993 to 2006. *Acta Sci Vet* 35, 79-82.
- Liu, J., Tan, C., Li, J., Chen, H., Xu, P., He, Q., Bei, W., 2008, Characterization of ISAp11, an insertion element identified from *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolate in China. *Vet Microbiol* 132, 348-354.
- Mohapatra, B.R., Mazumder, A., 2008, Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments. *Water Sci Technol* 58, 537-547.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebahia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 2001, Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413, 523-527.
- Piffer, I.A., Klein, C., Favero, M., Figueiredo, J.O., 1997, Biochemical and serological characterization of strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 49, 123-129.
- Radtke, A., Kong, F., Bergh, K., Lyng, R.V., Ko, D., Gilbert, G.L., 2009, Identification of surface proteins of group B streptococci: serotyping versus genotyping. *J Microbiol Methods* 78, 363-365.
- Rayamajhi, N., Shin, S.J., Kang, S.G., Lee, D.Y., Ahn, J.M., Yoo, S.Y., 2005, Development and use of a polymerase chain reaction assay based on

- Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 359 - 362.
- Redondo, C., Cubero, J., Melgarejo, P., 2009, Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis. *Mycopathologia* 168, 11-22.
- Rychlik, I., Bejckova, L., 1994, Oligonucleotide (GTG)₅ in bacterial DNA fingerprinting. *Vet Med (Praha)* 39, 567-578.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Analysis of genomic DNA by Southern hybridization, In: Nolan, C. (Ed.) *Molecular Cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 9.32.
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., Frey, J., 1999, Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145 (Pt 8), 2105-2116.
- Schaller, A., Kuhnert, P., de la Puente-Redondo, V.A., Nicolet, J., Frey, J., 2000, Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Vet Microbiol* 74, 365-376.
- Schuchert, J.A., Inzana, T.J., Angen, O., Jessing, S., 2004, Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42, 4344-4348.
- Serrano-Rubio, L.E., Tenorio-Gutierrez, V., Suarez-Guemes, F., Reyes-Cortes, R., Rodriguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Godinez-Vargas, D., de la Garza, M., 2008, Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars 1 and 2 in pigs using a PCR assay. *Mol Cell Probes* 22, 305-312.
- Shin, S.J., Shin, S.W., Kang, M.L., Lee, D.Y., Yang, M.S., Jang, Y.S., Yoo, H.S., 2007, Enhancement of protective immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA or ApxIIA in mice. *J Vet Sci* 8, 383-392.
- Siguier, P., Filee, J., Chandler, M., 2006a, Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* 9, 526-531.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M., 2006b, ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34, D32-36.
- Sthitmatee, N., Sirinarumit, T., Makonkewkeyoon, L., Sakpuaram, T., Tesaprateep, T., 2003, Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx genes. *Mol Cell Probes* 17, 301-305.
- Svec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedlacek, I., Swings, J., 2005, Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 247, 59-63.
- Tegetmeyer, H.E., Jones, S.C.P., Langford, P.R., Baltus, N., 2008, ISAp11, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76. *Vet Microbiol* 128, 342-353.
- Touchon, M., Rocha, E.P., 2007, Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes. *Mol Biol Evol* 24, 969-981.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007, The human microbiome project. *Nature* 449, 804-810.

- Turni, C., Blackall, P.J., 2007, An evaluation of the *apxIVA* based PCR-REA method for differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 121, 163-169.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19, 6823-6831.
- Versalovic, J., Lupski, J.R., 1998, Interspersed Repetitive Sequences in Bacterial Genomes, In: Brujin, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (Eds.) *Bacterial Genomes - Physical Structure and Analysis*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, pp. 38-47.
- Wilson, M.K., Lane, A.B., Law, B.F., Miller, W.G., Joens, L.A., Konkel, M.E., White, B.A., 2009, Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. *Microb Ecol* 58, 843-855.
- Wise, M.G., Healy, M., Reece, K., Smith, R., Walton, D., Dutch, W., Renwick, A., Huong, J., Young, S., Tarrand, J., Kontoyiannis, D.P., 2007, Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J Med Microbiol* 56, 778-787.
- Xu, Z., Zhou, Y., Li, L., Zhou, R., Xiao, S., Wan, Y., Zhang, S., Wang, K., Li, W., Jin, H., Kang, M., Dalai, B., Li, T., Liu, L., Cheng, Y., Zhang, L., Xu, T., Zheng, H., Pu, S., Wang, B., Gu, W., Zhang, X.L., Zhu, G.F., Wang, S., Zhao, G.P., Chen, H., 2008, Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. *PLoS One* 3, e1450.
- Zekri, A.R., Bahnassy, A.A., Ramadan, A.S., El-Bassuoni, M., Badran, A., Madwar, M.A., 2001, Hepatitis C virus genotyping versus serotyping in Egyptian patients. *Infection* 29, 24-26.
- Zhou, L., Jones, S.C.P., Angen, O., Bosse, J.T., Nash, J.H.E., Frey, J., Zhou, R., Chen, H.C., Kroll, J.S., Rycroft, A.N., Langford, P.R., 2008, Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 800-803.
- Zhu, L.J., Zheng, F.Y., Zhao, Y.Z., Xing, X.N., Li, Q., Gu, G.X., 2006, Study on application of rep-PCR fingerprint in rapid identification of beer-spoilager. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 22, 1013-1020.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1

PCR-REA do gene *apxIVA*. Perfil de restrição observado após o tratamento do amplicon do gene *apxIVA* com as enzimas de restrição *AluI*, *HhaI* e *HpaII* em linhagens referência dos sorotipos 2, 8 e 15.

<i>AluI</i>			<i>HhaI</i>			<i>HpaII</i>		
(Sorotipo referência)								
02	08	15	02	08	15	02	08	15
		3410			3410			
			2210	2210				1960
1190							1580	1300
1070	1090	1090				1090	1090	
920			880	880	920			
790								790
						590	590	
	440				440	440	440	
	380			380	380	380	380	
								330
	290							
	250		230					
210								
180	160	180	180	180	180			
		160		150		130	130	150
						90	90	90

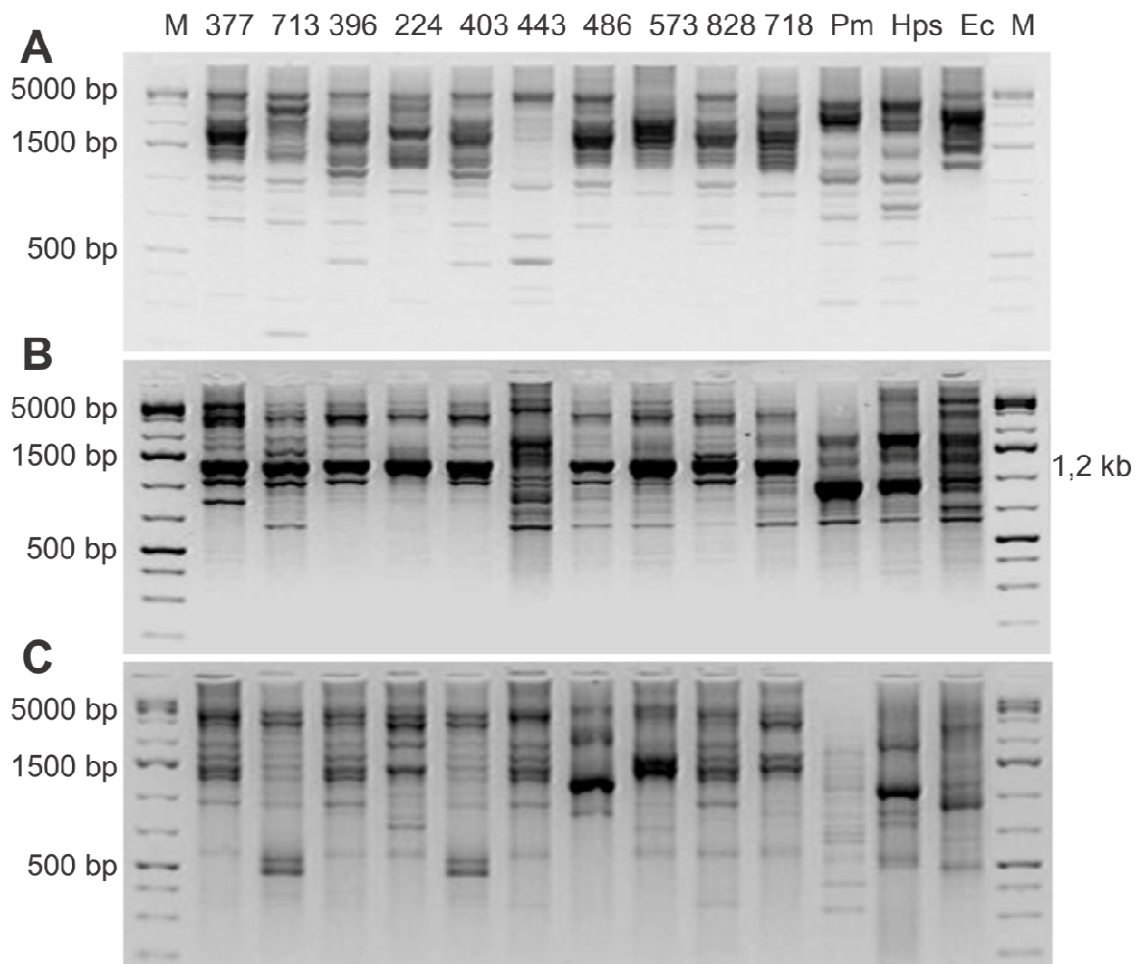


Figura S1: Perfis de fragmento observados na amplificação de elementos genômicos repetitivos pelas técnicas de ERIC-PCR (A), BOX-PCR (B) e (GTG)₅-PCR (C), realizadas em alguns isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e em cepas de *Pasteurella multocida* (Pm), *Haemophilus parasuis* (Hps), *Escherichia coli* (Ec). M = Marcador O'GeneRuler® 1 kb DNA Ladder

Tabela S2

Distribuição do elemento IS*Apl1* nos genomas dos três isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* disponíveis no banco de dados Genbank. A busca foi feita com o banco ISfinder.

Cepa	Sorotipo	Acesso	Origem	Posições
L20	05a	CP001091	Canadá	1889266 – 1890683 1716182 – 1717599 1638207 – 1639624 698655 – 700072 1057710 – 1059128 1138282 – 1139697 1228651 – 1230067 227906 – 228790
JL03	03	CP000687	China	2345785 – 2346202 1740386 – 1441803 1090917 – 1092334 1670769 – 1672186 732277 – 733161 2194762 – 2195646 1262495 – 1263379
AP76	07	CP000569	Alemanha	1193232 – 1194649 1677228 – 1678645 1611008 – 1612425 1023039 – 1024456 2050385 – 2051802 2100843 – 2102252 228690 – 230097 249821 – 250705 659327 – 660211

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO DO GENE *omIA* EM DIFERENTES SOROTIPOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*: UMA NOVA VISÃO DE UMA ANTIGA ABORDAGEM

Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista Veterinary Microbiology

RESUMO

ROSSI, Ciro César. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011
Caracterização do gene *omIA* em diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*: uma nova visão de uma antiga abordagem. Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-orientadoras: Marisa Vieira de Queiroz, Elza Fernandes de Araújo e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

A proteína OmlA é um fator de virulência em *Actinobacillus pleuropneumoniae*, um importante patógeno de suínos. Neste trabalho os polimorfismos presentes nas sequências nucleotídicas no gene *omIA* dos 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e de isolados de campo não sorotipáveis por métodos convencionais foram acessados com o objetivo de se realizar uma reconstrução filogenética que demonstrasse a relação evolutiva entre os isolados e validasse a importância desse gene como um marcador molecular na caracterização dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. Adicionalmente, foram avaliadas a estrutura do gene *omIA*, a estrutura secundária da proteína OmlA e a organização do gene em isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* obtidos na região sudeste do Brasil. A reconstrução filogenética revelou que a diferenciação entre os 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae* ocorreu em dois eventos evolutivos que permitiram a separação dos mesmos em nove grupos distintos, possibilitando a caracterização da maioria dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, incluindo isolados não sorotipáveis e contornando os problemas de reação cruzada observados na maioria dos sorotipos. Embora haja diferenças na estrutura da proteína OmlA entre os diferentes sorotipos, uma alfa-hélice formada pelos primeiros vinte aminoácidos é comum a todos, provavelmente envolvida na ligação da proteína à membrana e atuando como peptídeo sinal. Ainda que a organização do gene *omIA* seja semelhante na maioria dos isolados brasileiros, existem alguns com características marcantes e diferenciais, como uma duplicação inédita, que reflete a variabilidade genética existente e pode justificar a dificuldade em se sorotipar alguns isolados. Estes dados reafirmam a importância do gene *omIA* no estudo de *A. pleuropneumoniae* e propõem novas pesquisas com a proteína OmlA.

1. INTRODUÇÃO

Doenças respiratórias são responsáveis por um grande impacto econômico gerado na suinocultura. A pleuropneumonia suína (PPS) configura-se como uma das mais importantes entre estas doenças, caracterizada por pneumonia e pleurite fibrinosa, necrótica e hemorrágica, sendo relatada em todos os países em que a suinocultura é intensiva (Shin et al., 2007). Os prejuízos consequentes da PPS derivam do fato de que esta pode resultar em diminuição da média diária de ganho de massa corporal, perdas por necessidade de abate precoce e gastos com intervenções, como medicação e vacinação, além da morte do animal (Kim e Lee, 2006; Straw e Taylor, 2006).

O principal agente etiológico da PPS é o cocobacilo Gram-negativo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pertencente à família Pasteurellaceae (Biberstein e Hirsh, 2003). Atualmente são conhecidos 15 sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, definidos com base em propriedades antigênicas dos polissacarídeos da cápsula e lipopolissacarídeos da parede celular. Apesar de todos os sorotipos serem capazes de causar doença, existem diferenças na virulência (Schuchert et al., 2004). Por isso, a sorotipagem de isolados de campo de *A. pleuropneumoniae* é um fator chave no estudo epidemiológico e no controle da doença, uma vez que a prevalência e a virulência dos diferentes sorotipos podem variar entre países e regiões (Dubreuil et al., 2000).

Um grande número de ensaios sorológicos foi desenvolvido para a caracterização sorológica de isolados de *A. pleuropneumoniae* (Jessing et al., 2003; Lacouture et al., 1997). Embora os ensaios imunológicos sejam relativamente rápidos, estes apresentam como principal limitação o fato de comumente resultarem em reações cruzadas (Jessing et al., 2003), ou seja, a ocorrência de reatividade de alguns anticorpos policlonais a um antígeno diferente do imunógeno contra o qual foi criado. Na prática, este problema representa erros de classificação sorológica e, portanto, abordagem terapêutica muitas vezes ineficiente (Lacouture et al., 1997; Mittal e Bourdon, 1991; Mittal et al., 1988; Mittal et al., 1993).

Muitas técnicas moleculares têm sido empregadas para estudar a epidemiologia molecular de diferentes patógenos bacterianos (Macêdo et al.,

2009). Estas novas técnicas buscam marcadores moleculares que permitam complementar as informações obtidas com as técnicas sorológicas. Um importante constituinte da membrana externa de *A. pleuropneumoniae* é a proteína OmlA (*outer membrane lipoprotein A*), produto do gene *omlA*. Esta proteína é membro da família de proteínas SmpA/OmlA encontrada em proteobactérias (Fuangthong et al., 2008). Porém, este grupo de pequenas proteínas ainda permanece pouco caracterizado (Vanini et al., 2008). As proteínas de membrana externa de bactérias Gram-negativas, como *A. pleuropneumoniae*, desempenham importantes papéis na colonização e infecção em um determinado hospedeiro e frequentemente são alvos para a síntese de vacinas (Chung et al., 2008).

O produto do gene *omlA* de isolados de *A. pleuropneumoniae* dos sorotipos 1 e 5 foi utilizado com sucesso na imunização em suínos, reduzindo consideravelmente a mortalidade (Bunka et al., 1995). Embora haja poucas informações sobre a função da proteína OmlA na patogênese da pleuropneumonia suína causada por *A. pleuropneumoniae*, um trabalho realizado por Gerlach et al. (1993) revelou a presença do gene *omlA* nos isolados de *A. pleuropneumoniae* de diferentes sorotipos, ainda que as proteínas produzidas revelassem diferenças antigênicas de acordo com o sorotipo do isolado de origem.

A filogenia molecular baseada em polimorfismos presentes em sequências de genes ou fragmentos de diferentes *loci*, por exemplo, tem sido frequentemente utilizada para caracterizar e distinguir sorotipos ou isolados de diversos micro-organismos (Gonzalez-Escalona et al., 2008; Nakamura et al., 2000; Nightingale et al., 2005; Ward et al., 2004)

O objetivo deste estudo foi analisar os polimorfismos do gene *omlA* de isolados pertencentes a diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e avaliar o seu emprego como possível marcador molecular na determinação do sorotipo de isolados deste micro-organismo. Espera-se assim ampliar as ferramentas moleculares empregadas na genotipagem de *A. pleuropneumoniae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Micro-organismos, condições de cultivo e manutenção*

Os isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e as linhagens referência desta bactéria utilizados neste estudo foram fornecidos pela empresa MICROVET – Microbiologia Veterinária Especial (Viçosa, Minas Gerais). Os isolados foram obtidos a partir de pulmões e tonsilas de animais com sinais clínicos de pleuropneumonia distribuídos em diferentes áreas na região sudeste do Brasil, sendo a maioria destes obtidos no Estado de Minas Gerais. Os isolados foram previamente identificados por testes bioquímicos e sorotipados por imunodifusão. Todos os isolados foram cultivados a 37° C por 24h em meio de infusão de cérebro e coração (BHI – brain heart infusion) suplementado com 0,01 % de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e mantidos em jarra de anaerobiose em 5% de CO₂.

2.2 *Manipulação de DNA*

O DNA total de isolados bacterianos foi obtido com o kit *Wizard Genome DNA Purification kit*TM (Promega, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O par de oligonucleotídeos LPF (5'-AAG GTT GAT ATG TCC GCA CC-3') e LPR (5'-CAC CGA TTA CGC CTT GCC A-3') (Gram e Ahrens, 1998) foi utilizado para amplificar o gene *omIA* (cujo amplicon apresenta um tamanho de aproximadamente 1200 pb). A reação de PCR foi realizada com 1U da enzima GoTaqTM DNA polimerase (Promega, Madison, USA) em um volume final de 25 µL do tampão da enzima contendo 0,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo e 50 ng de DNA no aparelho termociclador C1000TM (BioRad, Richmond, USA). O DNA foi submetido a uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 seg, anelamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 45 seg, e extensão do oligonucleotídeo a 72 °C por 4 min. Para a extensão final, após o último ciclo, a reação foi submetida a 72 °C por 10 min. O fragmento de DNA que corresponde ao gene *omIA* obtido a partir da

amplificação do DNA total dos diferentes isolados foi observado após eletroforese em gel de agarose 1,0 %. O fragmento gerado foi purificado utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*TM (Promega, Madison, USA) e submetido a sequenciamento.

2.3 Obtenção das sequências de nucleotídeos

As sequências de nucleotídeos utilizadas neste trabalho são referentes ao gene *omlA* de isolados *Actinobacillus pleuropneumoniae* de diferentes sorotipos e origens. Os números de acesso no banco de dados Genbank (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) e os sorotipos dos respectivos isolados estão listados na tabela 1. Sequências nucleotídicas de isolados dos sorotipos 13, 14 e 15, anteriormente não existentes nos bancos de dados, foram obtidas no presente trabalho e foram depositadas com os números de acessos JF311904, JF304624 e JF304622, respectivamente. Adicionalmente, foram sequenciados neste estudo os genes *omlA* de isolados cujos sorotipos não puderam ser definidos por métodos imunológicos convencionais (acessos JF30418-20, JF304621 e JF304623).

Tabela 1

Números de acesso no banco de dados Genbank (NCBI), sorotipo e fonte das sequências nucleotídicas do gene *omlA* utilizadas neste trabalho.

Acesso	Sorotipo	Fonte	Acesso	Sorotipo	Fonte	Acesso	Sorotipo	Fonte
AB007572	01		U86675	01		L06318	01	(Gerlach et al., 1993)
AB007573	02		U86676	02		EU251513	01	Genbank
AB007574	03		U86677	03		NC_010939	07	
AB007575	04		U86678	04		D28491	05a	(Ito et al., 1995)
AB007576	05a		U86679	5a		Z48920	05	(Bunka et al., 1995)
AB007577	05b	(Ito, 2008)	U86680	5b	(Gram e Ahrens, 1998)	JF311904	13	
AB007578	06		U86681	06		JF304624	14	
AB007579	07		U86682	07		JF304622	15	
AB007580	08		U86683	08		JF304618	ND	Este trabalho
AB007581	09		U86684	09		JF304619	ND	
AB007583	11		U86685	10		JF304620	ND	
AB007584	12		U86686	11		JF304621	ND	
			U86687	12		JF304623	ND	

2.4. Análise estrutural do gene *omlA*

As sequências nucleotídicas correspondentes ao gene *omlA* de diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* foram caracterizadas. A predição dos pontos +1 da tradução e o códon de parada da tradução foi feita com a ferramenta de análise ORF *finder* (Rombel et al., 2002). As sequências -10 e -35 correspondentes à região promotora do gene *omlA* foram preditos pelo *Bacterial Promoter Prediction Program*, BPPROM (www.softberry.com), programa este que reconhece promotores bacterianos específicos do fator sigma70. O BPPROM também foi utilizado para predizer possíveis *cis* elementos de reconhecimento de fatores de transcrição considerando-se a região promotora predita e sítios de ligação conhecidos para diversos fatores de transcrição.

2.5. Análise estrutural da proteína *OmlA*

A sequência de aminoácidos codificada pelo gene *omlA* foi predita por meio do programa Mega 5.03, utilizando-se o código genético bacteriano. A estrutura secundária putativa foi predita com o algoritmo *Phyre* (Kelley e Sternberg, 2009) e confrontada com a estrutura predita pelo algoritmo *Jnet* do *Jpred3* (Cole et al., 2008). Neste estudo, apenas as estruturas com probabilidade acima de 80 % foram consideradas na construção do modelo da estrutura consenso da proteína *OmlA*. O modelo TMHMM, baseada no modelo de Markov foi utilizado para a predição de hélices transmembrana (Krogh et al., 2001). A busca por domínios conservados foi feita pelo banco de dados do PROSITE (Sigrist et al., 2010) e pelo banco de dados *Conserved Domain Database* (Marchler-Bauer et al., 2009).

2.6. Análise filogenética molecular

As 38 sequências nucleotídicas utilizadas neste trabalho foram inicialmente alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (Larkin et al., 2007),

sendo visualmente inspecionadas e manualmente corrigidas utilizando-se a sequência de aminoácidos deduzida pelo código genético bacteriano com o programa Mega 5.03 (Tamura et al., 2007). Sequências incompletas disponíveis nos bancos de dados e com menos de 1000 pb não foram utilizadas neste estudo.

A árvore filogenética foi construída utilizando-se três métodos diferentes: máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e neighbour joining (NJ). As árvores foram inferidas pelo programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford, 2003). O programa ModelTest versão 3.7 (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para testar 56 modelos de modo a estabelecer o modelo de evolução de DNA que melhor se adequava aos dados para a análise de ML. O modelo de escolha foi o Tamura Nei considerando-se uma proporção de 0.4572 % de sítios invariáveis. Então uma busca heurística foi feita, iniciando com uma árvore de NJ e utilizando o algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR).

Para estimar a robustez de cada nó interno das árvores, uma análise estatística foi feita utilizando o *bootstrapping* (1000 repetições para os métodos NJ e MP e 100 repetições para o método ML) com o programa PAUP*. Como os valores de *bootstrap* tendem a ser conservativos (Sanderson e Shaffer, 2002), foi feita uma análise Bayesiana, utilizando o software Mr. Bayes 3.0 (Huelsenback e Ronquist, 2001). O melhor modelo para se realizar a análise foi inferido com o programa Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004). O modelo escolhido foi o modelo *General Time Reversible* com sítios invariáveis (GTR + I). As árvores filogenéticas geradas neste trabalho foram visualizadas e editadas com o programa Fig Tree 1.3.1, disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

2.7. Estudo da organização do gene *omIA* em isolados de *A. pleuropneumoniae*

A análise do número de cópias e organização do gene *omIA* no genoma de diferentes isolados obtidos na região de estudo foi feita pela técnica de *Southern blotting* (Sambrook et al., 1989). Para este estudo, onze isolados de

suínos com sinais clínicos de pleuropneumonia obtidos entre os anos de 2003 e 2010 em seis diferentes granjas localizadas na região sudeste do Brasil foram selecionados. Entre eles estão incluídos quatro isolados não sorotipáveis. O par de *primers* omlAhF (5' CGG TTT AGT CGC AGG TTT AGT 3') e omlAhR (5' TCC TTA ACC CCT AAT TCC TTA AGA 3') foi utilizado para a síntese de uma sonda de 372 pb para a hibridização (Figura 1D). A sonda foi feita com o kit *PCR DIG Probe Synthesis Kit*TM (Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as indicações do fabricante. Um volume correspondente a 5 µg de DNA total dos isolados foi submetido a clivagem por 16h com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bgl*II, que reconhecem regiões adjacentes e opostas do fragmento da ORF do gene *omlA* utilizado como sonda, gerando um fragmento esperado de 943 pb. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e transferidos para uma membrana de nylon Amersham HybondTM-N⁺ (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Inglaterra) de acordo com os procedimentos indicados por Sambrook et al. (1989). A hibridização foi realizada em condições de alta estrigência a 42 °C com o kit *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II*TM (Roche, Mannheim, Alemanha). As condições de lavagem foram: 5 min em SSC 2X + SDS 0,1 % e 5 min em SSC 0,5X + SDS 0,1 %, ambas em temperatura ambiente, seguido por 15 min em SSC 0,5X + SDS 0,1 % e 15 min em SSC 0,1X + SDS 0,1 % a 65 °C. Posteriormente, prosseguiu a etapa de revelação de acordo com a sugestão do fabricante. O resultado foi visualizado e capturado com fotodocumentador L-Pix Chemi (Loccus, São Paulo, Brasil).

3. RESULTADOS

3.1. Análise das sequências

As 38 sequências do gene *omlA* analisadas são ricas em AT (média de 64,2 %, contra 35,8 % de GC), apresentando média de porcentagens das bases guanina, citosina, timina e adenina de, respectivamente, 20,6 %, 15,2 %, 25,8 % e 38,4 % (material suplementar, Tabela S1). Os valores são ligeiramente menores que o valor do conteúdo GC observado nos três

genomas sequenciados de *A. pleuropneumoniae* disponíveis no banco de dados Genbank. Os conteúdos GC das cepas AP76 (sorotipo 07) e JL03 (sorotipo 03) – acessos CP000569 e CP000687, respectivamente – são de 41,2 % e o da cepa L20 (sorotipo 05a) é de 41,3% (acesso CP001091).

As sequências utilizadas neste estudo têm entre 1098 e 1361 pares de base, representando um total de 662 sítios variáveis (em torno 47 %) dentre as 1421 posições alinhadas (o número de posições alinhadas superior ao tamanho das sequências deve-se à ocorrência de *gaps* no alinhamento).

Este alinhamento revelou que a grande variabilidade nas sequências nucleotídicas decorreu de 218 substituições de base, sendo 68 (31 %) destas na primeira base do códon, 58 (27 %) na segunda e 92 (42 %) na terceira (Tabela S2). A organização dos códons no código genético garante que as substituições de base mais frequentes tenham menos consequências deletérias para a função da proteína, o que é garantido principalmente pela possibilidade de oscilação da terceira base de um códon sem alterar o aminoácido traduzido (Epstein et al., 2000). Embora grande parte das substituições nucleotídicas tenha ocorrido na terceira base (42 %), a maioria destas ocorreu na primeira e na segunda base, que refletiram em um grande número de sítios variáveis na sequência de aminoácidos deduzida pelo software MEGA 5.03. Entre as 386 posições alinhadas de aminoácidos observados na tradução da sequência codificadora, 245 sítios são variáveis, o que representa 63,5 % do total.

A extensiva quantidade de alterações na sequência primária da proteína OmlA é decorrente tanto de transições quanto de transversões. Geralmente as taxas de transições são aproximadamente duas vezes maiores que as taxas de transversões (Zhang e Gerstein, 2003). Isto se justifica pelo fato de que as transversões constituem na substituição de uma pirimidina por uma purina ou vice-versa, e este tipo de mutação geraria distorções na molécula de DNA. As médias dos números de transversões e transições decorrentes das substituições no gene *omlA*, entretanto, foram muito próximas, sendo os valores de transições iguais a 108 (51,4 %) e de transversões iguais a 110 (48,6 %), respectivamente; o que equivale a uma razão de transições/transversões

de aproximadamente 0,99 (material suplementar, Tabela S2). Portanto, as altas taxas de transversões observadas para o gene *omlA* demonstram a grande variabilidade genética que estes genes adquiririam no curso evolutivo dos diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*.

3.2. Análise estrutural do gene *omlA*

A análise estrutural do gene *omlA* de todas as sequências disponíveis dos quinze sorotipos caracterizados de *A. pleuropneumoniae* revelou que este gene possui uma sequência aberta de leitura ou ORF (*open reading frame*) que é delimitada pelos códons ATG e TAA como, respectivamente os códons de iniciação (que codifica o aminoácido metionina) e terminação, o que resulta em um tamanho entre 1086 e 1125 pares de base.

O alinhamento das sequências no programa Mega 5.03 mostrou que, como observado por Gram et al. (1998), a região inicial do gene é bastante conservada. A região compreendida entre os pontos +1 da tradução e o ponto +160 apresenta 87,5 % de seus nucleotídeos idênticos para todas os sorotipos, sendo que as diferenças são observadas apenas para poucas amostras. Este elevado grau de conservação sugere a existência de um domínio de grande importância funcional para o gene.

A análise da sequência pelo programa BPPROM revelou o provável posicionamento das regiões -10 e -35 nos promotores dos genes *omlA* caracterizados. A primeira é constituída por nove nucleotídeos e consiste na sequência consenso TTGTAAATT, como pode ser observado no alinhamento dos promotores das sequências utilizadas neste trabalho (Figura 1A). Esta sequência apresentou-se conservada em todos os isolados analisados. A região central do elemento -10 localiza-se entre 44 a 46 pares de base *upstream* ao ponto de início da tradução. O elemento -35 é constituído por seis nucleotídeos e apresenta a sequência consenso TTTATB, em que B representa o nucleotídeo G (em 83 % das sequências) ou o nucleotídeo A (17 %). A região central do elemento -35 localiza-se entre 66 e 68 pares de base *upstream* ao ponto de início da tradução.

Na região promotora do gene, as sequências TTATATTT e TATTTATT foram recorrentes e o programa BPRM sugere que estas podem ser regiões de interação com fatores de ligação. A primeira sequência é encontrada no banco de dados do programa como consenso para o ativador transcricional GcvA, conhecido por ativar o sistema de clivagem do aminoácido glicina, ativando o operon *gcvTPH* (Wilson et al., 1995). Portanto, esta região pode ser considerada um elemento putativo de ligação para um fator de transcrição cujo sítio de ligação ao DNA seja estruturalmente semelhante ao da proteína GcvA. Esta repetição de bases, entretanto, não foi encontrada em todas as sequências, estando ausente em três das 34 analisadas. Além disso, em uma das sequências, Z48920 (sorotipo 5), este sítio apresenta-se adjacente à região -35 do promotor. Mais interessante é o fato de que a segunda sequência corresponde a um possível sítio de ligação para a proteína regulatória Lrp. A proteína Lrp é um regulador transcricional global e a família desta proteína é amplamente distribuída entre bactérias e archaeas (Brinkman et al., 2003).

Para facilitar a ligação do ribossomo, próximo ao sítio de início da tradução em procariotos, existe uma pequena sequência chamada de Shine-Dalgarno. A região putativa Shine Dalgarno foi inferida baseada na composição e na posição da sequência consenso (Watson et al., 2004). Esta se localiza entre 6 e 7 nucleotídeos *upstream* ao início da tradução e tem a sequência consenso AAGGAA, idêntica em todas as sequências analisadas. A Figura 1B apresenta um esquema da organização da região promotora do gene *omIA*, estabelecida a partir da análise de todas as sequências disponíveis, incluindo os quinze sorotipos.

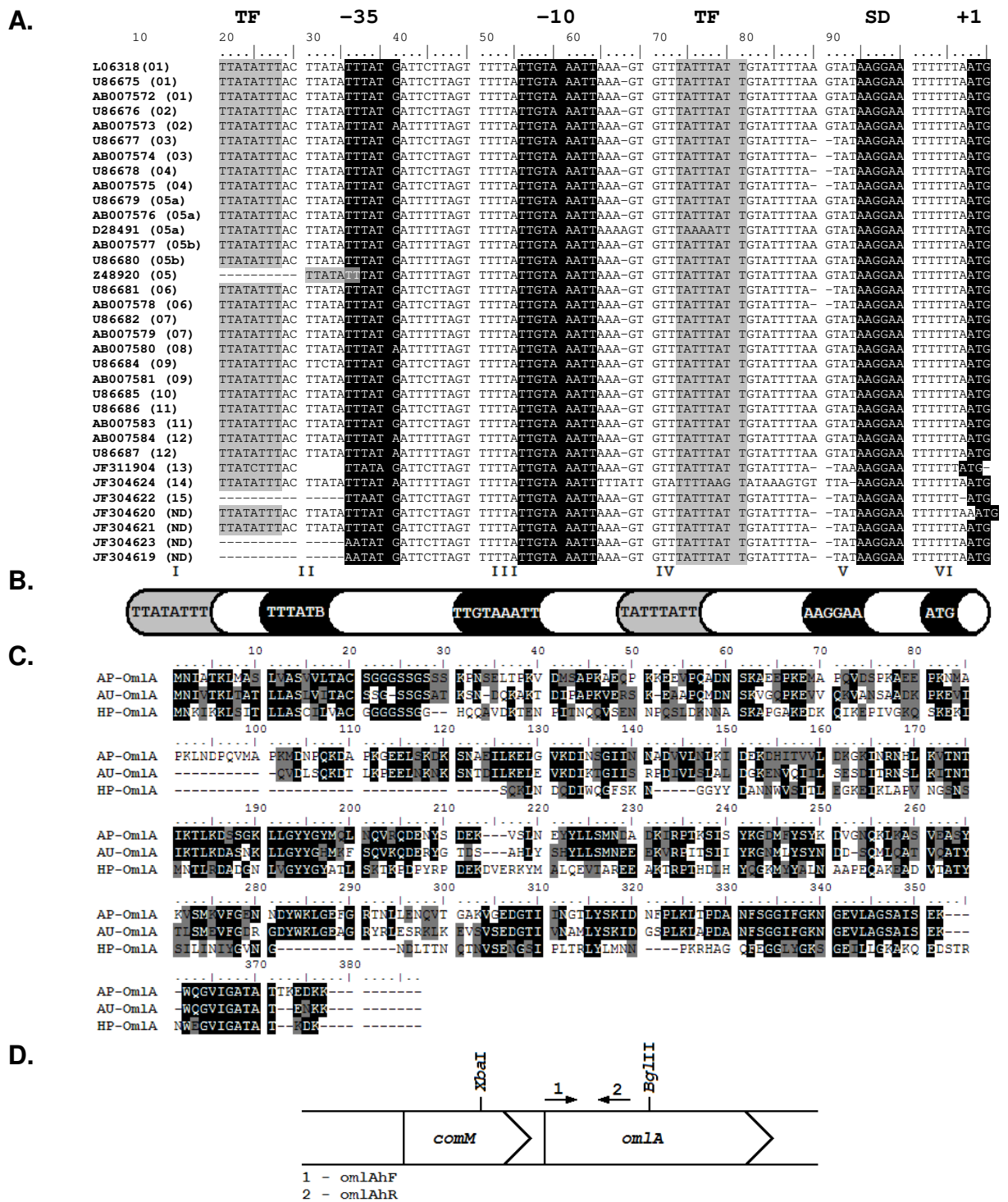


Figura 1. Caracterização do gene *omlA* e da proteína OmlA de diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (A) Região promotora do gene *omlA* de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pertencentes aos 15 sorotipos descritos. São destacados os sítios putativos de ligação a fatores de transcrição (TF), as regiões -35, -10, Shine Dalgarno (SD) e o ponto +1 da tradução. (B) Esquema da região promotora do gene *omlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. O modelo foi construído baseado no alinhamento realizado em (A) São destacadas as sequências consenso para possíveis *cis* elementos para a ligação fatores de transcrição (I e IV), a região -35 (II), a região -10 (III), a região Shine Dalgarno (V) e o sítio de início da tradução (VI). B = Adenina (17 %) ou Guanina (83 %) (C) Alinhamento das sequências de aminoácidos de OmlA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (AP), *Actinobacillus ureae* (AU) e *Haemophilus parasuis* (HP). As sequências idênticas são destacadas em preto e as similares em cinza. (D) Região do gene *omlA* utilizada para a síntese da sonda para a reação de *Southern blotting* e sítio de clivagem das enzimas utilizadas.

3.3. Análise estrutural da proteína OmlA

A sequência deduzida de aminoácidos da proteína OmlA apresenta entre 362 e 375 resíduos de aminoácidos, sendo 80 % dos 58 primeiros idênticos em todas as sequências analisadas neste trabalho, o que reforça uma importância funcional desta região da proteína. Embora a busca por sequências nucleotídicas homólogas à do gene *omlA* no Genbank não demonstre homologia significativa com nenhuma outra espécie, a sequência primária da proteína OmlA de *A. pleuropneumoniae* assemelha-se à sequência primária da mesma proteína em *Actinobacillus ureae* e *Haemophilus parasuis*, ambos da família Pasteurellaceae. O alinhamento da sequência primária da proteína destas três espécies é apresentado na Figura 1C e revela a conservação da estrutura de OmlA, incluindo a região N-terminal, o que reforça a sua importância.

Para a predição da estrutura secundária da proteína, uma vez que foram observadas incongruências entre diferentes programas de predição desta estrutura, foram utilizados dois algoritmos diferentes, o Jpred 3 e o Phyre, que foram recentemente atualizados e analisados (Cole et al., 2008; Kelley e Sternberg, 2009). Os perfis estruturais gerado pelos dois foram confrontados e um modelo da estrutura secundária da proteína foi construído (Figura 2). Para a construção deste modelo, apenas as estruturas com probabilidade acima de 80 % foram consideradas. O modelo de estrutura secundária deduzida revela a organização de grande parte da proteína em folhas beta, cujas posições podem variar de acordo com o sorotipo, e a existência de apenas uma alfa-hélice, conservada em todos os sorotipos, localizada entre o quinto e o vigésimo aminoácido. Esta região constitui a sequência aminoacídica KLIAGLVAGLVLTAC na maioria dos sorotipos, sendo observadas variações apenas nas sequências dos sorotipos 1, 9, 11 e 8. Nestes casos, os terceiro (isoleucina), quinto (glicina), nono (glicina) e décimo (leucina) aminoácidos são substituídos, respectivamente pelos aminoácidos metionina, serina e valina, constituindo a sequência KLMSLVASVLTAC. Apesar desta alteração, a diferença na sequência não altera a formação de uma alfa-hélice devido ao fato de que os aminoácidos alterados continuam sendo do mesmo grupo:

isoleucina, metionina, leucina e valina são aminoácidos não polares e hidrofóbicos e o par glicina/serina consistem de aminoácidos polares e sem carga.

A função da alfa-hélice conservada na proteína OmlA foi investigada quanto ao seu posicionamento transmembrana pelo modelo TMHMM (Krogh et al., 2001). Em nenhuma das análises feitas neste trabalho houve a predição de existência de uma hélice transmembrana nesta proteína, o que indica que esta estrutura deva estar envolvida em outra função. A busca por domínios conservados no banco de dados do PROSITE (Sigrist et al., 2010) relacionou os vinte primeiros aminoácidos da sequência aminoacídica ao perfil de sítio de ligação a lipídio (perfil PS51257) e ao peptídeo sinal. Portanto, a alfa-hélice presente na estrutura da proteína OmlA pode estar relacionada ao sítio de ancoragem da proteína à membrana externa, além de direcionar o transporte da proteína para sua localização extracelular.

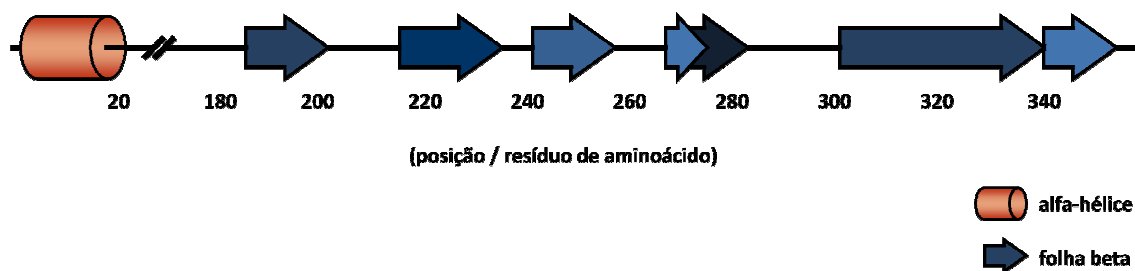


Figura 2. Estrutura secundária putativa da proteína OmlA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* deduzida pelos algoritmos Jpred3 e QuickPhyre. O cilindro representa a alfa-hélice e as setas representam folhas-beta. As intensidades das cores das setas refletem a recorrência desta estrutura nos quinze sorotipos, em que a coloração mais clara indica a ocorrência em 50 % dos 15 sorotipos e a mais escura indica a ocorrência em 100 % destes.

Adicionalmente, uma pesquisa feita no *Conserved Domain Database* (Marchler-Bauer et al., 2009) mostrou que esta proteína pertence à superfamília da Lipoproteína 5, descrita como proteína que se liga à transferrina e está distantemente relacionada a outras famílias de proteínas

que se ligam a solutos. A pesquisa no banco de dados de famílias de proteínas Pfam (Finn et al., 2010) apontou que quase totalidade da sequência aminoacídica da proteína está relacionada à superfamília Lipoproteína 5, uma vez que os resíduos nas posições 1 a 88, 108 a 180 e 193 a 358 (com variações de alguns resíduos de aminoácidos de acordo com cada sorotipo) são assinalados como conservados.

3.4. Análise filogenética

Uma vez que os genes *omlA* de outros organismos são estruturalmente muito distantes daquele encontrado em *A. pleuropneumoniae*, não foi utilizado um grupo externo para permitir a melhor separação entre os 15 sorotipos e, portanto, as árvores filogenéticas resultantes são não enraizadas.

A árvore filogenética obtida a partir da sequência de nucleotídeos do gene *omlA* de *A. pleuropneumoniae* por análise Bayesiana identificou nove grupos distintos baseado no sorotipo do micro-organismo (Figura 3). Um grupo é composto pelos sorotipos 1, 9 e 11; um segundo grupo composto pelo sorotipo 12; o terceiro pelos sorotipos 2 e 8, o quarto pelo sorotipo 14, o quinto pelos sorotipos 3, 4 e 6, o sexto pelo sorotipo 7, o sétimo pelos sorotipos 5 e 10, o oitavo pelo sorotipo 13 e o nono pelo 15, sendo os valores de *bootstrap* igualmente altos para todos os métodos de reconstrução filogenética utilizados. O mesmo foi observado para os valores de probabilidade posterior obtidos na análise Bayesiana (próximos de ou iguais a 100 %).

A separação dos isolados em tantos grupos era esperada pelas análises feitas com o alinhamento. Enquanto a região inicial dos genes é grandemente conservada, como ressaltado anteriormente, na região interna e terminal do gene é observada grande variabilidade genética entre os sorotipos, uma vez que o alinhamento mostrou haver 52 % de sítios variáveis. Estas diferenças nas sequências são bruscamente diminuídas quando são considerados separadamente alguns dos grupos que foram formados na reconstrução filogenética.

No grupo composto pelos sorotipos 1, 9 e 11, o número de sítios variáveis de aminoácidos entre eles é de 4 em 440 (0,9 %), e o número de sítios variáveis na sequência de nucleotídeos é de 5 em 1320 (0,4 %). Para avaliar se a separação monofilética destes três sorotipos não era influenciada pela grande divergência com as outras sequências, foram feitos alinhamentos e reconstruções filogenéticas separadas para os três sorotipos, utilizando-se os mesmos métodos empregados anteriormente. Entretanto, a conservação das sequências do gene *omIA* para estes sorotipos (99,1 %) impediu a separação deles em grupos baseada em seus sorotipos, como esperado (dados não apresentados).

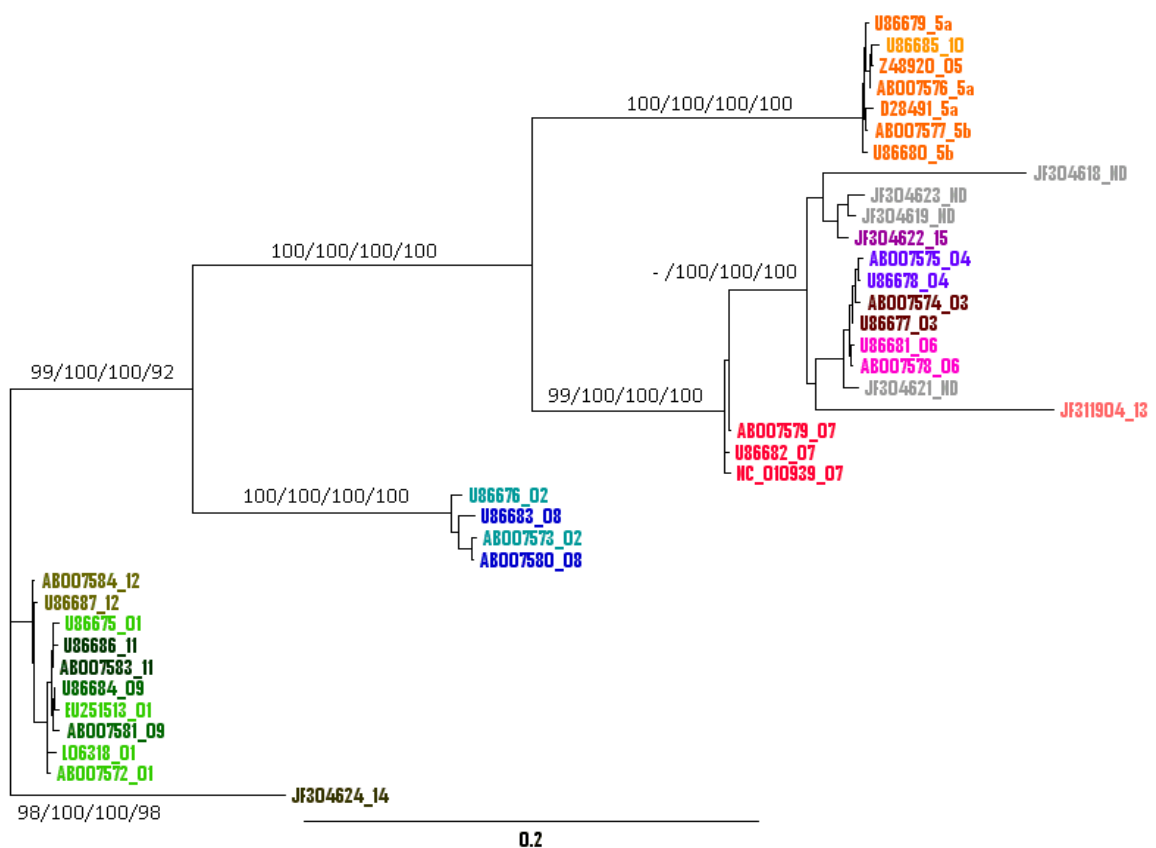


Figura 3. Árvore filogenética construída por análise Bayesiana utilizando trinta e sete sequências do gene *omIA* dos quinze sorotipos diferentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Ao lado dos ramos da árvore são mostrados os valores de bootstrap de cada um dos três métodos filogenéticos usados (Neighbour joining, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, respectivamente), bem como os valores de probabilidade poosterior encontrados para a árvore consenso da análise Bayesiana. Na figura são mostrados os números de acesso seguidos pelos sorotipos das sequências utilizadas. Sorotipos diferentes são realçados com cores diferentes.

Para o grupo composto pelos sorotipos 2 e 8, os mesmos sítios variáveis foram de 1,5 % e 0,9 %, respectivamente. Para o grupo composto pelos sorotipos 5 e 10, os valores foram de, respectivamente 3,6 % e 2,5 %. E para o grupo composto pelos sorotipos 3, 4, 6 e 7, esses valores foram de 3,6 % e 2,5 %, respectivamente.

O agrupamento em clados adjacentes entre os sorotipos 3 e 6 revela uma proximidade evolutiva que provavelmente justifica a ocorrência de reações cruzadas entre estes sorotipos (Mittal et al., 1988). Não foi observado, porém, um agrupamento do sorotipo 8 próximo aos sorotipos 3 e 6. Este, ao contrário, formou um grupo com o sorotipo 2. Como o perfil de agrupamento observado entre os sorotipos 2 e 8 foi inesperado, a monofilia de cada um deles foi examinada pelo teste de Shimodaira e Hasegawa (Shimodaira e Hasegawa, 1999). Como o valor de p obtido foi maior que 0,05, a árvore de máxima verossimilhança em que os sorotipos 2 e 8 aparecem com o perfil de agrupamento da figura 3 é estatisticamente equivalente ao perfil de uma árvore em que estes sorotipos aparecem separados, embora no mesmo ramo.

Um agrupamento foi observado entre os sorotipos 5 e 10, em um ramo monofilético. Semelhante ao que foi feito para os sorotipos 1, 9 e 11, para avaliar se a separação monofilética destes três sorotipos não era influenciada pela grande divergência com as outras sequências, foram feitos alinhamentos e reconstruções filogenéticas separadas para os dois sorotipos, utilizando-se os mesmos métodos empregados anteriormente. Entretanto, a conservação das sequências do gene *omIA* para estes sorotipos (97,5 %) também impediu a separação deles em grupos baseada em seus sorotipos (dados não apresentados). Um clado adicional é composto apenas pelo sorotipo 12, sendo este próximo dos sorotipos 1, 9 e 11, o que pode ser observado na figura 2. Um clado foi composto pelo sorotipo 13 e outro pelo sorotipo 15 e os três isolados de sorotipo duvidoso. Neste caso, portanto, a análise da sequência do gene *omIA* destes permitiu a caracterização do sorotipo destes isolados. O sorotipo 14 foi posicionado isoladamente dos demais na árvore filogenética. O isolado cujo sorotipo não pôde ser determinado por métodos imunológicos e,

consequentemente, foi caracterizado como não-sorotipável (sequência JF304621), agrupou-se no clado do sorotipo 6.

A topologia radial da mesma árvore apresentada na Figura 3 evidencia melhor que a diferenciação nos 15 diferentes sorotipos pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* ocorreu em dois eventos evolutivos distintos (destacados pela seta na Figura 4), o que permite a separação dos isolados em dois *clusters*: o primeiro composto pelos sorotipos 1, 2, 8, 9, 11, 12 e 14 o segundo pelos sorotipos 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13 e 15.

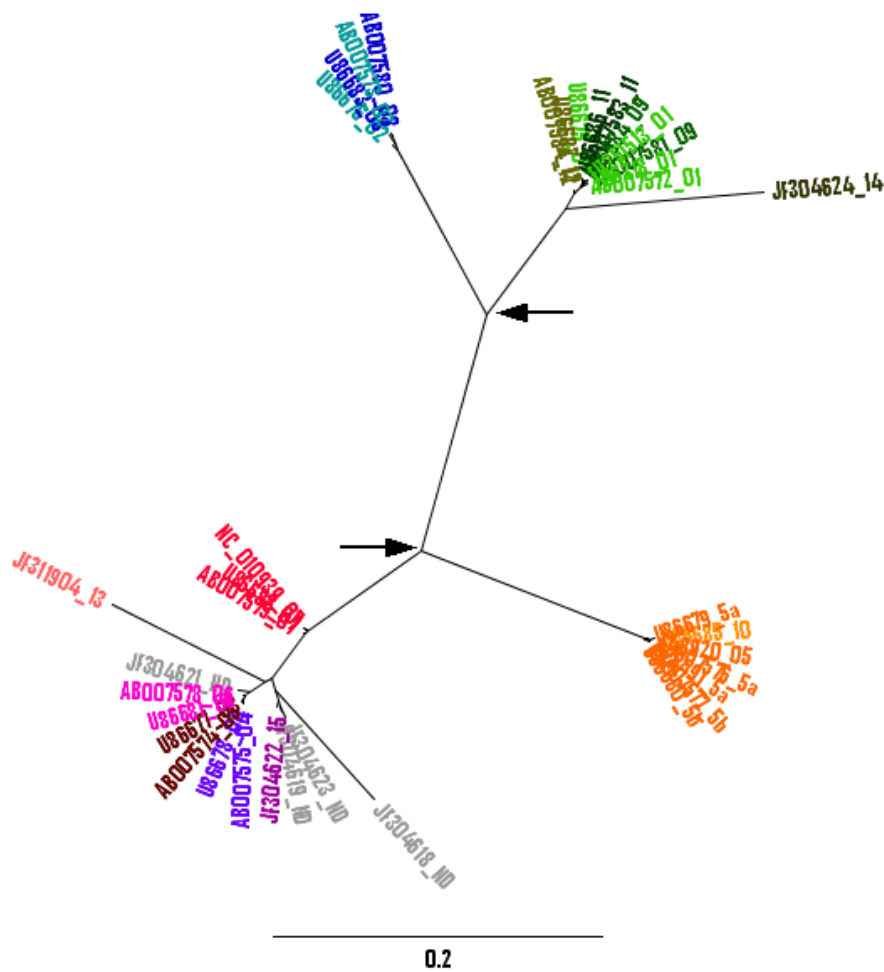


Figura 4. Topologia radial da árvore filogenética construída por análise Bayesiana utilizando trinta e sete sequências do gene *omIA* dos quinze diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Na figura são mostrados os números de acesso seguidos pelos sorotipos das sequências utilizadas. Sorotipos diferentes são realçados com cores diferentes.

O perfil de agrupamentos observado na reconstrução filogenética feita com a sequência de nucleotídeos do gene *omIA* apresenta-se muito semelhante àquele obtido quando a reconstrução é feita com a sequência predita de aminoácidos com o código genético bacteriano (Figura 5). A grande diferença é que neste segundo caso, os organismos do sorotipo 4 distanciaram-se dos sorotipos 3 e 6. Esta diferença é possivelmente devido à duplicação de uma sequência presente entre as posições +144 a +176 (Genbank nº U86678 e AB007575), o que confere à proteína OmlA dos isolados deste sorotipo 11 aminoácidos a mais em relação à média dos demais.

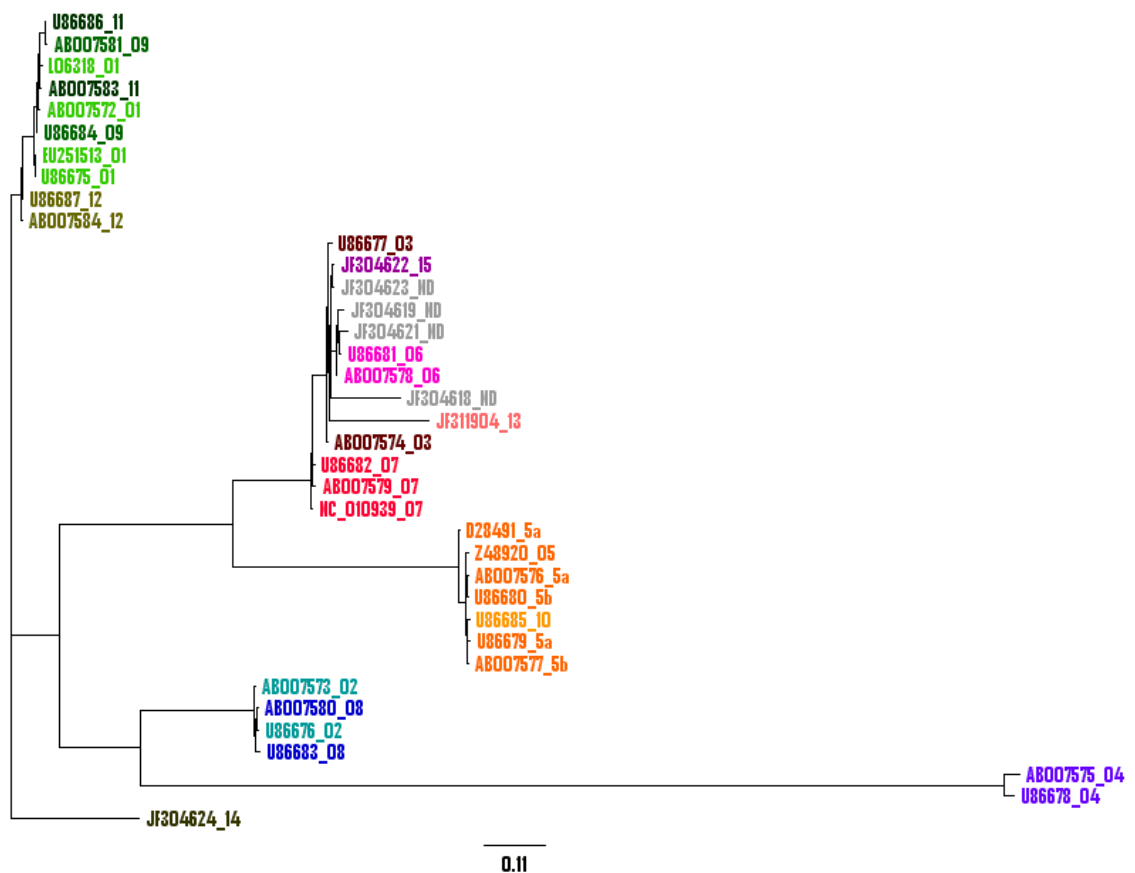


Figura 5. Árvore filogenética construída por análise Bayesiana utilizando trinta e sete sequências aminoacídicas preditas a partir dos genes *omIA* dos quinze sorotipos diferentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Na figura são mostrados os números de acesso seguidos pelos sorotipos das sequências utilizadas. Sorotipos diferentes são realçados com cores diferentes.

3.5. Organização do gene *omlA* em isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae*

Uma vez que a sequência nucleotídica do gene *omlA* varia muito entre os sorotipos, o par de primers *omlAhF/omlAhR* foi sintetizado de acordo com a região conservada na extremidade inicial do gene *omlA*, gerando uma sonda de tamanho esperado de 372 pares de bases. Nesta avaliação foi pesquisada a organização do gene em quatro isolados de *A. pleuropneumoniae* não sorotipáveis e outros sete isolados presentes em sete diferentes áreas na região sudeste do Brasil, contemplando as três principais regiões envolvidas com a suinocultura no Estado de Minas Gerais.

Os resultados da técnica de hibridização são apresentados na Figura 6.

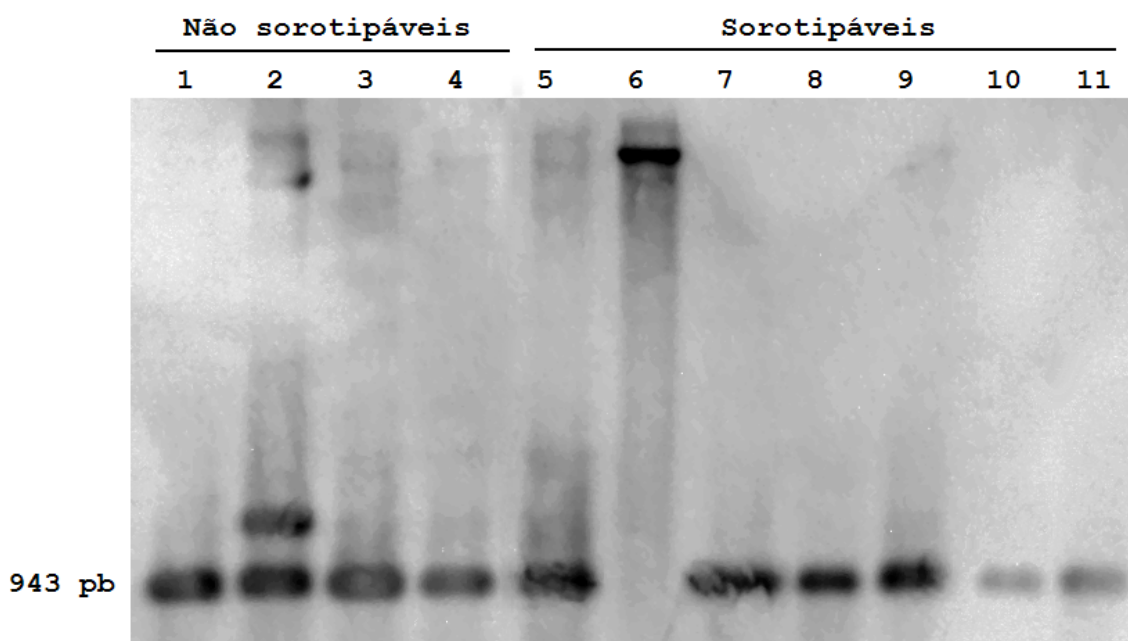


Figura 6. Organização do gene *omlA* em *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Foram analisados por *Southern blotting* diferentes isolados clínicos obtidos em sete áreas na região sudeste do Brasil, incluindo isolados não sorotipáveis. Isolados clínicos: (1) 235, (2) 452, (3) 497, (4) 718, (5) 573, (6) 653, (7) 433, (8) 513, (9) 5651, (10) 512, (11) 5237.

A hibridização revelou que a organização do gene *omlA* é mantida na maioria dos isolados presentes nas regiões avaliadas, apresentando o fragmento de 943 pares de bases esperado com a clivagem do DNA genômico. Dois destes isolados, porém, destoaram dos resultados esperados. O isolado 2

possui duas cópias do gene, o que mostra que as alterações que aconteceram no genoma da bactéria que impossibilitaram sua sorotipagem também afetaram a organização do gene *omIA*. Este relato é inédito e a duplicação pode apresentar alguma vantagem adaptativa para o micro-organismo, por exemplo na adaptação a novos ambientes (Bratlie et al., 2010). Por outro lado, se este gene duplicado não apresentar uma vantagem adaptativa, ele pode se tornar inativo por mutações, gerando um pseudogene que, eventualmente pode ser perdido do genoma por deleção (Lynch e Conery, 2000). O isolado 6 também apresentou uma organização diferente dos demais isolados mas, aparentemente, este isolado também apresenta apenas uma cópia do gene. Uma vez que o fragmento apresentou-se num tamanho acima de 10 kb, o genoma deste isolado provavelmente não possui as mesmas sequências de reconhecimento para clivagem pelas enzimas *XbaI* e *BglII* que os outros isolados possuem (Figura 6).

4. DISCUSSÃO

A proteína OmlA (*outer membrane lipoprotein A*) é considerado um fator de virulência em *A. pleuropneumoniae*. Sua importância deve-se ao fato de que esta proteína, com uma massa molecular calculada de 40 kDa - modificada por adição de lipídeos e presente na membrana externa e em eventuais protuberâncias da membrana de *A. pleuropneumoniae* - se ligar à transferrina (Gerlach et al., 1992). Proteínas que se ligam a transferrina são consideradas fatores de virulência por permitirem a aquisição de ferro do hospedeiro (Baltes et al., 2002; Renauld-Mongenie et al., 2004).

A proteína OmlA pertence a uma família de pequenas lipoproteínas bacterianas amplamente distribuídas entre beta e gama proteobactérias (Vanini et al., 2008). Recentemente, Fuangthong et al. (2008) isolaram e caracterizaram a proteína OmlA de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e mostraram que esta se relaciona à resistência do micro-organismos a alguns antibióticos, indicando a importância desta proteína na manutenção da integridade da membrana neste organismo. Vanini et al. (2008) descobriram

que a proteína OmlA produzida por *Xanthomonas axonopodis* pv. citri está envolvida na interação planta-patógeno e está implicada em uma interação proteína-proteína, requerida durante a infecção. Uma vez que estes micro-organismos são de uma ordem diferente de *A. pleuropneumoniae* não é uma surpresa o fato de o gene *omlA* de *A. pleuropneumoniae* não apresentar a sequência nucleotídica com semelhanças significativas às sequências de outras espécies, como observado pela busca com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do banco de dados Genbank. Este trabalho mostrou, no entanto, que a sequência primária da proteína OmlA apresenta semelhanças estruturais com a mesma proteína em *Actinobacillus ureae* e *Xanthomonas campestris*. Informações funcionais não podem ser comparadas por falta de estudos em *A. pleuropneumoniae*.

Estudos anteriores demonstraram o potencial do gene *omlA* para genotipar linhagens de *A. pleuropneumoniae* de diferentes sorotipos. Osaki et al. (1997), por exemplo, observaram uma diversidade genética nos genes *omlA* de diferentes sorotipos *A. pleuropneumoniae* ao submeterem um amplicon de 970 pb a digestão por enzimas de restrição. Com este estudo foi possível dividir os 12 sorotipos em cinco grupos distintos. Gram et al. (1998) utilizaram as sequências dos genes *omlA* dos 12 sorotipos até então conhecidos e conseguiram dividi-los em quatro grupos distintos. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um método para a tipagem de *A. pleuropneumoniae* baseado na reação em cadeia da polimerase, em que as diferenças na região interna do gene *omlA* possibilitaram dividir os sorotipos de 1 a 12 de *A. pleuropneumoniae* em cinco grupos (Gram et al., 2000a).

Outros trabalhos anteriores fizeram uso da filogenia molecular de diversos genes para classificar isolados de diferentes micro-organismos e até mesmo separar sorotipos (Gonzalez-Escalona et al., 2008; Nakamura et al., 2000; Noel et al., 2005). No presente estudo, parte do trabalho de Gram et al. (1998) foi revisitado e os polimorfismos existentes no gene *omlA* dos 15 sorotipos atualmente conhecidos foram identificados e utilizados para a realização de uma reconstrução filogenética utilizando métodos e modelos mais recentes e acurados, como a inferência baesiana, o que permitiu não somente a

separação dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* em grupos distintos, como possibilitou acessar a relação evolutiva entre os diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*. Adicionalmente, os genes *omlA* de cinco isolados de *A. pleuropneumoniae* isolados cuja sorotipagem era inconclusiva foram sequenciados e analisados.

Ainda que em algumas situações a sorotipagem não seja essencial para o tratamento de uma infecção devido à ocorrência de proteção cruzada entre sorotipos diferentes induzida por vacina, este não é o caso de *A. pleuropneumoniae* (Hsu et al., 2009). Várias pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra *A. pleuropneumoniae* foram estimuladas nos últimos anos devido ao impacto econômico da doença causada por esse micro-organismo na indústria suinocultora (Chiang et al., 2009). Todavia, a existência de muitos sorotipos tem dificultado a vacinação efetiva (Oldfield et al., 2008). Vacinas preparadas com células inertes fornecem apenas imunidade sorotipo-específica, fazendo com que os animais permaneçam sensíveis a infecções por sorotipos não incluídos na vacina (Nielsen, 1984). O uso de outros imunógenos separados, como é o caso da proteína OmlA, também mostrou-se limitado a conferir a imunidade do suíno a alguns sorotipos específicos, devido à grande diferença antigênica existente entre os sorotipos (Gerlach et al., 1993). Esta realidade reforça a importância da caracterização dos isolados presentes em uma determinada área. Agravante ainda é o fato de existirem muitos isolados de *A. pleuropneumoniae* que não são sorotipáveis pelas técnicas corriqueiramente utilizadas, mas que são também capazes de causar doença (Fenwick, 2002). Nosso estudo mostrou que os polimorfismos presentes na sequência nucleotídica do gene *omlA* podem ser utilizados como ferramentas na caracterização de isolados considerados como não sorotipáveis pelos métodos convencionais, uma vez que todos os isolados que não puderam ser classificados anteriormente pelo nosso grupo posicionaram-se junto a outros sorotipos suportados por altos valores de *bootstrap* e probabilidade posterior.

A reconstrução filogenética feita neste trabalho com o gene *omlA*, além de ter validado a utilização deste gene para a distinção de diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, reforça características observadas previamente. O

agrupamento dos sorotipos 1, 9 e 11, por exemplo, foi condizente com as reações cruzadas que são observadas entre estes micro-organismos. Cada sorotipo de *A. pleuropneumoniae* tem uma composição diferente de lipopolissacarídeo (LPS), mas epítomos comuns são compartilhados pelo antígeno-O e são responsáveis por reações cruzadas encontradas entre os sorotipos 1, 9 e 11 (Paradis et al., 1999).

Fortes reações cruzadas também foram observadas por Mittal et al. (1988) entre os sorotipos 3, 6 e 8. Foi demonstrado que as técnicas de aglutinação em tubo, coaglutinação e hemaglutinação indireta não eram suficientemente sensíveis para diferenciar cepas destes sorotipos. Os dados obtidos no presente trabalho, entretanto, foram capazes de separar os três sorotipos em clados distintos, sendo os clados dos sorotipos 3 e 6 monofiléticos (Figura 3).

Em 1991, Mittal et al. estudaram as propriedades antigênicas de isolados de *A. pleuropneumoniae* dos sorotipos 4 e 7 pelos testes de aglutinação, coaglutinação, hemaglutinação indireta, imunodifusão e contraímunoeletroforese. Vários destes testes apresentaram reações cruzadas para os isolados dos dois sorotipos (Mittal e Bourdon, 1991). As semelhanças antigênicas entre as cepas de ambos os sorotipos demonstram a proximidade evolutiva dos mesmos, o que pôde ser endossado pelo agrupamento próximo deles baseado no alinhamento do gene *omlA*. Neste caso, todavia, o problema da reação cruzada foi contornado, uma vez que estes sorotipos ficaram separados em ramos monofiléticos (Figura 3).

O agrupamento de alguns destes sorotipos, além de poder ser relacionado com a reação cruzada observada entre eles, pode ser correlacionada com outro aspecto fenotípico importante: a produção das exotoxinas Apx, consideradas os principais fatores de virulência de *A. pleuropneumoniae* (Vanden Bergh et al., 2008). Embora a virulência seja multifatorial, dados de epidemiologia molecular mostram que o grau de patogenicidade está fortemente relacionado à produção e secreção de exotoxinas, como ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV (Chien et al., 2009; Vanden Bergh et al., 2009). A presença de genes individuais nos operons das diferentes

toxinas Apx é constante em um determinado sorotipo e reflete a produção, bem como o potencial de secretar ApxI, ApxII e ApxIII (Ramjeet et al., 2008). Os sorotipos 1, 9 e 11, todos agrupados em um mesmo clado, apresentam a mesma característica fisiológica quanto à produção e secreção de toxinas Apx: estes sorotipos secretam as toxinas ApxI e ApxII, além da toxina ApxIV, que é comum a todos os sorotipos (Cho e Chae, 2001; Schaller et al., 1999). Semelhantemente, os sorotipos 2 e 8, agrupados juntos produzem as toxinas ApxII e ApxIII. O mesmo perfil é observado para os sorotipos 3, 4 e 6, que se agruparam em um clado separado dos demais (Figura 1). As toxinas Apx apresentam graus variados de atividades hemolítica e citotóxica (Chien et al., 2009). Portanto, o agrupamento dos sorotipos em diferentes clados pode, pelo menos em parte, ser relacionado ao grau de virulência dos mesmos. Algumas incongruências, porém, podem ser observadas, como a separação dos sorotipos 7 e 12, ambos secretores de apenas toxinas ApxII e ApxIV.

Este estudo demonstra que os polimorfismos presentes nas sequências nucleotídicas do gene *omIA* podem ser utilizados como marcadores não somente para a análise filogenética dos sorotipos como para a separação dos sorotipos dos isolados. Os resultados mostram que os sorotipos 3, 4, 6, 7 e 12 são agrupados em clados individuais e a separação entre todos os sorotipos investigados contorna problemas de reação cruzada observados entre os sorotipos 3, 6 e 8 e 4 e 7 (Mittal e Bourdon, 1991; Mittal et al., 1988). O agrupamento monofilético entre os sorotipos 1, 9 e 11, entretanto, foi de acordo com as reações cruzadas que ocorrem entre eles (Mittal et al., 1993). Neste caso, o polimorfismo do gene *omIA* não é um marcador eficaz na classificação do sorotipo. Para os demais casos, nosso trabalho apresentou uma alternativa para a caracterização e conseqüentemente elaboração estratégias de controle de isolados de *A. pleuropneumoniae* cuja distinção possa ser problemática.

Uma técnica de análise de restrição de um produto de PCR (PCR-REA), sugerida por Turni e Blackall (2007) foi incorporada por nosso grupo com o gene *apxIVA* e classificou os isolados de sorotipo duvidoso (entre 2, 8 ou 15) dos quais as sequências JF304618, JF304619 e JF304623 foram obtidas como pertencente ao sorotipo 8 (dados ainda não publicados). Contrastando com

estes resultados, os mesmos isolados foram classificados como do sorotipo 15 neste trabalho. Uma pesquisa realizada por Gram et al. (2000b) evidenciou a existência de isolados do sorotipo 8 cujo gene *omlA* se assemelhava aos sorotipos 3, 4, 6 e 7, ao contrário do que é geralmente observado – a semelhança com o sorotipo 2. Acreditamos que assim como foi observado no trabalho de Gram, alguns isolados de *A. pleuropneumoniae* presentes no Brasil possivelmente apresentam uma nova variação do gene *omlA*, especificamente no sorotipo 8.

Ainda que a expressão do gene *omlA* tenha se mostrado constitutiva em outros organismos (Ochsner et al., 1999), não existem informações sobre a expressão deste gene em *A. pleuropneumoniae*. O modelo estrutural da região promotora do gene *omlA* aponta a existência de possíveis sítios de ligação a fatores de transcrição, o que indica que este gene possa ter sua expressão controlada. Adicionalmente, embora possam existir algumas incongruências no uso de diversos *softwares* nas predições de estrutura secundária, todos estes apontaram a existência de uma região conservada possivelmente envolvida na ligação da proteína OmlA à região lipídica da membrana externa de *A. pleuropneumoniae* e atuação como peptídeo sinal. A predição da estrutura terciária não pôde ser feita por carência de homólogos nos bancos de dados.

O trabalho realizado por Gerlach et al (Gerlach et al., 1993) demonstrou a presença do gene *omlA* em todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* e o mesmo tipo de organização no genoma por *Southern blotting*. No presente estudo demonstramos que variações podem ser observadas na organização do gene *omlA* em diferentes isolados de *A. pleuropneumoniae*. Um dos isolados estudados em especial, apresentou duas cópias do gene, o que não havia sido descrito anteriormente. As alterações no número de cópias de um determinado gene e outras mudanças na estrutura cromossomal ocorrem principalmente por mecanismos de recombinação homóloga, que requerem extensivas regiões de identidade de sequências no genoma (Hastings et al., 2009). Uma vez que o elemento transponível IS*Apl1* foi descrito em *A. pleuropneumoniae* por Tegetmeyer et al. (2008), eventos de recombinação homóloga podem ser parcialmente explicados pela presença de múltiplas cópias do elemento no

genoma do isolado, o que pode ter ocasionado o aumento no número de cópias do gene *omIA* no genoma do isolado 235. Além disso, a ausência de sequências similares à do gene *omIA* com quaisquer sequências de outros micro-organismos depositadas no banco de dados Genbank (NCBI) sugere que o gene *omIA* seja um bom marcador molecular na designação da espécie.

Como é apontado por Bossé et al. (2002), o conhecimento quanto aos mecanismos moleculares e patogenicidade de *A. pleuropneumoniae* ainda estão muito aquém daqueles conhecidos para outras bactérias Gram-negativas. Este fato ainda pode ser agravado pela disponibilidade de ainda apenas três genomas sequenciados para este micro-organismo.

As informações quanto à caracterização estrutural do gene *omIA* e seu produto mostradas neste trabalho carecem de confirmação funcional experimental constituem um impulso para novas pesquisas, uma vez que certamente representarão um importante avanço na compreensão da infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Nosso grupo ainda acredita no grande potencial para a pesquisa que este gene possa proporcionar, pois, este apresenta interessantes variações sorotipo-específicas, o que o configura como um potencial imunógeno na criação de vacinas mais efetivas.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à empresa MICROVET pelo apoio e gentileza ao fornecer os isolados bacterianos de *A. pleuropneumoniae* utilizados neste estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baltes, N., Hennig-Pauka, I., Gerlach, G.F., 2002, Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. FEMS Microbiology Letters 209, 283-287.
- Biberstein, E.L., Hirsh, D.C., 2003, *Actinobacillus*, In: Hirsh, D.C., Zee, Y.C. (Eds.) Microbiologia Veterinária. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, p. 446.
- Bosse, J.T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., Langford, P.R., 2002, *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes Infect 4, 225-235.
- Bratlie, M.S., Johansen, J., Sherman, B.T., Huang da, W., Lempicki, R.A., Drablos, F., 2010, Gene duplications in prokaryotes can be associated with environmental adaptation. BMC Genomics 11, 588.
- Brinkman, A.B., Ettema, T.J., de Vos, W.M., van der Oost, J., 2003, The Lrp family of transcriptional regulators. Mol Microbiol 48, 287-294.
- Bunka, S., Christensen, C., Potter, A.A., Willson, P.J., Gerlach, G.F., 1995, Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. Infect Immun 63, 2797-2800.
- Chiang, C.H., Huang, W.F., Huang, L.P., Lin, S.F., Yang, W.J., 2009, Immunogenicity and protective efficacy of ApxIA and ApxIIA DNA vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* lethal challenge in murine model. Vaccine 27, 4565-4570.
- Chien, M.S., Chan, Y.Y., Chen, Z.W., Wu, C.M., Liao, J.W., Chen, T.H., Lee, W.C., Yeh, K.S., Hsuan, S.L., 2009, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. Vet Microbiol 135, 327-333.
- Cho, W.S., Chae, C., 2001, Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Comp Pathol 125, 34-40.
- Chung, J.W., Jacques, M., Coulton, J.W., 2008, Outer membrane proteins and iron uptake of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. , In: Khunert, P., Christensen, H. (Eds.) Pasteurellaceae, Biology, Genomics and Molecular Aspects. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 144-175.
- Cole, C., Barber, J.D., Barton, G.J., 2008, The Jpred 3 secondary structure prediction server. Nucleic Acids Res 36, W197-201.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., Gottschalk, M., 2000, *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. Animal Health Research Reviews 1, 73 - 93.
- Epstein, R.J., Lin, K., Tan, T.W., 2000, A functional significance for codon third bases. Gene 245, 291-298.
- Fenwick, B., 2002, Porcine infectious pleuropneumonia, In: Bethel, M.A. (Ed.) Pork industry handbook. Michigan State University Extension.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A., 2010, The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 38, D211-222.
- Fuangthong, M., Sallabhan, R., Atichartpongkul, S., Rangkadilok, N., Sriprang, R., Satayavivad, J., Mongkolsuk, S., 2008, The omlA gene is involved in

- multidrug resistance and its expression is inhibited by coumarins in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Arch Microbiol* 189, 211-218.
- Gerlach, G.F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A.A., Willson, P.J., 1993, Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun* 61, 565-572.
- Gerlach, G.F., Anderson, C., Potter, A.A., Klashinsky, S., Willson, P.J., 1992, Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 60, 892-898.
- Gonzalez-Escalona, N., Martinez-Urtaza, J., Romero, J., Espejo, R.T., Jaykus, L.A., DePaola, A., 2008, Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J Bacteriol* 190, 2831-2840.
- Gram, T., Ahrens, P., 1998, Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. *J Clin Microbiol* 36, 443-448.
- Gram, T., Ahrens, P., Andreasen, M., Nielsen, J.P., 2000a, An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes--evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol* 75, 43-57.
- Gram, T., Ahrens, P., Angen, O., 2000b, Two *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8 reference strains in circulation. *J Clin Microbiol* 38, 468.
- Hastings, P.J., Lupski, J.R., Rosenberg, S.M., Ira, G., 2009, Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10, 551-564.
- Hsu, H.E., Shutt, K.A., Moore, M.R., Beall, B.W., Bennett, N.M., Craig, A.S., Farley, M.M., Jorgensen, J.H., Lexau, C.A., Petit, S., Reingold, A., Schaffner, W., Thomas, A., Whitney, C.G., Harrison, L.H., 2009, Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med* 360, 244-256.
- Huelsenback, J.P., Ronquist, F., 2001, Bayesian inference of filogenetic trees. *Bioinformatics Application Note* 17, 754-755.
- Ito, H., 2008, Development of typing methods of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the antigenic and genetic diversity of the protective outer membrane lipoprotein. *Japan Agricultural Research Quarterly* 42, 261 - 266.
- Ito, H., Uchida, I., Sekizaki, T., Ooishi, E., Kawai, T., Okabe, T., Taneno, A., Terakado, N., 1995, Molecular cloning of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane lipoprotein (OmlA) from serotype 5a. *Microb Pathog* 18, 29-36.
- Jessing, S.G., Angen, O., Inzana, T.J., 2003, Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 41, 4095-4100.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J., 2009, Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4, 363-371.
- Kim, T., Lee, J., 2006, Cloning and expression of genes encoding transferrin-binding protein A and B from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Protein Expr Purif* 45, 235-240.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001, Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567-580.

- Lacouture, S., Mittal, K.R., Jacques, M., Gottschalk, M., 1997, Serotyping *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the use of monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 337-341.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lynch, M., Conery, J.S., 2000, The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151-1155.
- Macêdo, N.R., Oliveira, S.R., Lage, A.P., Guedes, R.M.C., 2009, Molecular epidemiology of *Haemophilus parasuis*. *Ciência Rural* 39, 2576-2582.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Bryant, S.H., 2009, CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37, D205-210.
- Mittal, K.R., Bourdon, S., 1991, Cross-Reactivity and Antigenic Heterogeneity among *Actinobacillus-Pleuropneumoniae* Strains of Serotype-4 and Serotype-7. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 1344-1347.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., 1988, Quantitation of serotype-specific and cross-reacting group-specific antigens by coagglutination and immunodiffusion tests for differentiating *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains belonging to cross-reacting serotypes 3, 6, and 8. *J Clin Microbiol* 26, 985-989.
- Mittal, K.R., Kamp, E.M., Kobisch, M., 1993, Serological characterisation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. *Res Vet Sci* 55, 179-184.
- Nakamura, Y., Kano, R., Watanabe, S., Hasegawa, A., 2000, Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 38, 992-995.
- Nielsen, R., 1984, *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes--cross protection experiments. *Nord Vet Med* 36, 221-234.
- Nightingale, K.K., Windham, K., Wiedmann, M., 2005, Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J Bacteriol* 187, 5537-5551.
- Noel, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V.P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L., Viscogliosi, E., 2005, Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol* 43, 348-355.
- Nylander, J.A.A., 2004, MrModeltest v2. . Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. .
- Ochsner, U.A., Vasil, A.I., Johnson, Z., Vasil, M.L., 1999, *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA. *J Bacteriol* 181, 1099-1109.
- Oldfield, N.J., Donovan, E.A., Worrall, K.E., Wooldridge, K.G., Langford, P.R., Rycroft, A.N., Ala'Aldeen, D.A., 2008, Identification and characterization

- of novel antigenic vaccine candidates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vaccine 26, 1942-1954.
- Osaki, M., Sato, Y., Tomura, H., Ito, H., Sekizaki, T., 1997, Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (omIA) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Vet Med Sci 59, 213-215.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998, Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.
- Ramjeet, M., Deslandes, V., Goure, J., Jacques, M., 2008, *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. Anim Health Res Rev 9, 25-45.
- Renauld-Mongenien, G., Poncet, D., Mignon, M., Fraysse, S., Chabanel, C., Danve, B., Krell, T., Quentin-Millet, M.J., 2004, Role of transferrin receptor from a *Neisseria meningitidis* tbpB isotype II strain in human transferrin binding and virulence. Infect Immun 72, 3461-3470.
- Rombel, I.T., Sykes, K.F., Rayner, S., Johnston, S.A., 2002, ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. Gene 282, 33-41.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Analysis of genomic DNA by Southern hybridization, In: Nolan, C. (Ed.) Molecular Cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 9.32.
- Sanderson, M.J., Shaffer, H.B., 2002, Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 33, 49 - 72.
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., Frey, J., 1999, Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology 145 (Pt 8), 2105-2116.
- Schuchert, J.A., Inzana, T.J., Angen, O., Jessing, S., 2004, Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. J Clin Microbiol 42, 4344-4348.
- Shimodaira, H., Hasegawa, M., 1999, Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic trees. Mol Biol Evol 16, 1114 - 1116.
- Shin, S.J., Shin, S.W., Kang, M.L., Lee, D.Y., Yang, M.S., Jang, Y.S., Yoo, H.S., 2007, Enhancement of protective immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA or ApxIIA in mice. J Vet Sci 8, 383-392.
- Sigrist, C.J., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N., 2010, PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. Nucleic Acids Res 38, D161-166.
- Straw, B.E., Taylor, D.J., 2006, Diseases of the respiratory system, In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) Diseases of Swine. Wiley-Blackwell, pp. 169-170.
- Swofford, D.L., 2003, Paup*: Phylogenetics analysis using parsimony (*and other methods) version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24, 1596-1599.

- Tegetmeyer, H.E., Jones, S.C.P., Langford, P.R., Baltes, N., 2008, ISAp11, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76. *Vet Microbiol* 128, 342-353.
- Turni, C., Blackall, P.J., 2007, An evaluation of the apxIVA based PCR-REA method for differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 121, 163-169.
- Vanden Bergh, P.G., Zecchinon, L.L., Fett, T., Desmecht, D., 2008, Probing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIIA toxin-dependent cytotoxicity towards mammalian peripheral blood mononucleated cells. *BMC Res Notes* 1, 121.
- Vanden Bergh, P.G., Zecchinon, L.L., Fett, T., Desmecht, D., 2009, Porcine CD18 mediates *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIII species-specific toxicity. *Vet Res* 40, 33.
- Vanini, M.M., Spisni, A., Sforca, M.L., Pertinhez, T.A., Benedetti, C.E., 2008, The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri reveals a protein fold implicated in protein-protein interaction. *Proteins* 71, 2051-2064.
- Ward, T.J., Gorski, L., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Hutchins, J., Pupedis, K., 2004, Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 186, 4994-5002.
- Watson, J.J., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., 2004, Translation, In: Cummings, B. (Ed.) *Molecular Biology of the gene*. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, p. 413.
- Wilson, R.L., Urbanowski, M.L., Stauffer, G.V., 1995, DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the gcv and gcvA control regions of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177, 4940-4946.
- Zhang, Z., Gerstein, M., 2003, Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes. *Nucleic Acids Res* 31, 5338-5348.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1
Composição nucleotídica (nts) das sequências do gene *omIA* utilizadas neste estudo.

Sequência	Tamanho (nts)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	Sequência	Tamanho (nts)	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
AB007572	1162,0	26,4	14,8	38,6	20,2	JF304624	1135,0	26,9	17,1	36,4	19,6
AB007573	1166,0	25,1	15,5	39,0	20,3	JF311904	1123,0	27,5	16,3	37,9	18,3
AB007574	1158,0	25,9	15,3	38,0	20,8	L06318	1183,0	26,4	14,7	38,5	20,4
AB007575	1201,0	25,3	15,6	38,3	20,8	NC 010939	1098,0	24,4	15,3	38,9	21,4
AB007576	1140,0	25,5	14,6	38,6	21,2	U86675	1141,0	25,9	14,7	38,8	20,5
AB007577	1162,0	26,2	14,6	38,3	20,9	U86676	1170,0	25,2	15,6	38,9	20,3
AB007578	1158,0	25,9	15,3	38,1	20,7	U86677	1160,0	25,9	15,3	38,0	20,9
AB007579	1162,0	25,2	15,7	38,1	21,0	U86678	1195,0	25,3	15,6	38,2	20,9
AB007580	1166,0	25,1	15,5	39,0	20,3	U86679	1168,0	26,1	14,7	38,2	21,0
AB007581	1162,0	26,4	14,8	38,6	20,2	U86680	1162,0	26,2	14,6	38,3	20,9
AB007583	1152,0	26,5	14,7	38,5	20,3	U86681	1161,0	25,8	15,3	38,1	20,8
AB007584	1162,0	26,3	14,9	38,6	20,2	U86682	1156,0	25,2	15,6	38,2	21,0
D28491	1169,0	26,2	14,7	38,2	21,0	U86683	1173,0	25,1	15,6	39,0	20,3
EU251513	1098,0	25,7	14,5	39,2	20,7	U86684	1149,0	26,3	14,7	38,6	20,4
JF304618	1122,0	24,7	15,9	37,8	21,7	U86685	1168,0	26,2	14,7	38,1	21,0
JF304619	1124,0	24,8	15,7	38,6	20,8	U86686	1139,0	25,8	14,7	38,9	20,5
JF304621	1124,0	25,1	15,1	38,7	21,1	U86687	1154,0	26,3	14,7	38,6	20,3
JF304622	1124,0	24,7	15,5	38,5	21,3	Z48920	1361,0	26,7	14,8	37,0	21,5
JF304623	1130,0	24,7	15,4	38,7	21,2	Média	1157,8	25,8	15,2	38,4	20,6

Tabela S2

Frequência (%) de pares nucleotídicos observados no pareamento das 38 sequências utilizadas neste trabalho. São apresentadas as frequências totais e relativas às posições do par no códon de leitura (primeira coluna).

	li	si	Sv	R	Par de nucleotídeos																Total
					TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG	
Média	912	108	110	0,99	237	20	24	10	19	131	14	6	24	16	361	35	11	6	35	183	1129
1º	309	40	28	1,41	52	5	4	4	5	40	4	3	3	5	114	15	4	3	15	102	376
2º	319	26	32	0,81	78	4	4	2	4	67	8	2	5	8	133	9	1	2	8	41	376
3º	284	42	50	0,86	106	10	16	4	10	24	2	1	16	3	114	12	6	2	11	40	376

ii = pares idênticos, si = pares transicionais, sv = pares transversionais e R = si/sv.

CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho demonstra o uso de diferentes técnicas moleculares e de bioinformática no estudo das características genéticas de diferentes sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, representando assim, um importante avanço em relação às estratégias empregadas visando o melhor conhecimento deste micro-organismo. A associação entre as técnicas de PCR multiplex e PCR-REA com os genes *apx* foram comprovadamente eficientes na determinação do sorotipo dos isolados, contornando os problemas de reação cruzada observados com a sorotipagem imunológica. Embora a presença do elemento ISAp1 não tenha sido relacionada à impossibilidade em se sorotipar alguns isolados, foi comprovado que existe um grande número de cópias, inteiras ou incompletas, deste transposon, no genoma dos isolados. Este número elevado pode estar parcialmente relacionado à grande variabilidade genética observada entre os isolados por *rep*-PCR. Estas técnicas de *fingerprinting* foram relatadas pela primeira vez através deste estudo demonstraram ser úteis na análise da diversidade genética dos isolados. A importância da reação de BOX-PCR foi especialmente ressaltada, uma vez que esta não somente agrupa um maior número de isolados a partir de características em comum, como também evidencia a existência de um fragmento específico de *A. pleuropneumoniae*, que é um candidato a marcador molecular na identificação da espécie. Por meio de técnicas de bioinformática foi possível caracterizar a estrutura do gene *omIA* e sua região promotora, sendo esta altamente conservada em todos os sorotipos. A conservação também foi observada na estrutura putativa da proteína OmlA e sugeriu a existência de uma região de grande importância funcional e um possível candidato a produção de vacinas. Este trabalho ainda utilizou métodos de reconstrução filogenética que evidenciaram a relação evolutiva entre os isolados de diferentes sorotipos e mostraram que os polimorfismos presentes na sequência nucleotídica do gene *omIA* podem ser eficientemente utilizados no estudo das diferenças entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, reafirmando, assim, a importância do gene *omIA* e da proteína OmlA e endossam a importância destes no estudo de *A. pleuropneumoniae*. Novos estudos em relação à atividade do elemento ISAp1, à obtenção de um SCAR à

partir da reação de BOX-PCR e à caracterização funcional da proteína OmlA são impulsionados por este trabalho e constituem objetos de estudos futuros de nosso grupo de pesquisa.