

## Diferenciação de sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pela combinação de dois PCR multiplex

### Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes by the combination of two multiplex PCR

Lucas Fernando dos Santos<sup>I</sup> Klédna Constância Portes Reis<sup>II</sup> José Lúcio dos Santos<sup>II</sup>  
Maria Aparecida Scatamburlo<sup>\*</sup>

- NOTA -

#### RESUMO

A pleuropneumonia suína é uma importante doença respiratória que ocasiona grandes perdas econômicas na suinocultura. O *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) é o agente etiológico desta enfermidade que é classificado em 15 sorotipos. Estes secretam diferentes combinações das exotoxinas ApxI, ApxII, Apx III e ApxIV, que têm sido utilizadas na diferenciação dos sorotipos pela PCR multiplex (mPCR). A técnica descrita não permite a diferenciação dos sorotipos 2, 8 e 15 (apresentam mesmo padrão de amplificação) como também os sorotipos 12 e 13. Visando a melhorar a capacidade discriminatória desse procedimento, o presente trabalho descreve a combinação de um segundo mPCR baseado na amplificação de genes dos antígenos capsulares. O ensaio conjugado foi testado com cepas de referência pertencentes aos 15 sorotipos e também de 10 isolados de campo. A técnica proposta auxiliou na diferenciação dos 15 sorotipos testados (cepas de referência), como também proporcionou a identificação dos isolados de campo provenientes de casos clínicos, demonstrando que a técnica molecular é uma forma rápida e eficiente na identificação desse importante patógeno que afeta a criação de suínos, mesmo levando em consideração as limitações da técnica.

**Palavras-chave:** APP, suínos, diferenciação molecular, exotoxinas, pleuropneumonia.

#### ABSTRACT

The swine pleuropneumonia is a major respiratory disease that causes great economic losses in pig farming. The *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) is the etiologic agent of this disease and are classified into 15 serotypes. These secrete different combinations of exotoxins ApxI, ApxII, Apx III and ApxIV. They have been used in the differentiation of serotypes by multiplex PCR (mPCR). The reported technique does not

allow the differentiation of serotypes 2, 8 and 15 (exhibit same pattern of amplification) as well as serotypes 12 and 13. In order to improve the discriminatory capacity of this procedure, this paper describes the combination of a second mPCR based on amplification of genes of capsular antigens. The combined test was tested with reference strains belonging to 15 serotypes and also 10 field isolates. The proposed technique was capable of differentiating all 15 serotypes tested (reference strains), and was able to identify field isolates from clinical cases, demonstrating that the molecular technique is a quick and efficient identification of this important pathogen that affects the swine production. The proposed technique assisted in differentiating the 15 serotypes tested (reference strains), but also provided identification of field isolates from clinical cases, demonstrating that the molecular technique is a quick and efficient identification of this important pathogen that affects pig farming, even taking into account the limitations of the technique.

**Key words:** APP, swine, molecular differentiation, exotoxins, pleuropneumonia.

A pleuropneumonia suína é uma doença respiratória causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). É uma doença contagiosa, fibrinosa, hemorrágica e necrosante que ocasiona alta mortalidade nos animais afetados. Já foram descritos 15 sorotipos de APP (BLACKALL et al., 2002), os quais secretam diferentes combinações das exotoxinas, incluído: ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV (MUÑOZ, 2003). Essas são consideradas os principais fatores de virulência desse patógeno (BECK et al., 1994; CHIERS et al., 2010).

<sup>I</sup>Departamento de Veterinária, Laboratório de Doenças Bacterianas, Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida PH Holfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: masm@ufv.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Microbiologia Veterinária Especial LTDA (Microvet), Viçosa, MG, Brasil.

RAYAMAJHI et al. (2005) descreveram uma técnica molecular para distinguir os sorotipos de APP, baseando-se na amplificação dos genes das quatro exotoxinas Apx (PCR multiplex – mPCR). Porém, essa metodologia não foi capaz de distinguir todos os sorotipos, dentre os quais, um grupo que compreende os sorotipos 2, 8 e 15; além, de um segundo grupo, compreendendo os sorotipos 12 e 13. Outro alvo tem sido utilizado em diversos trabalhos para identificação de sorotipos de APP, empregando a amplificação de genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos capsulares (cps). JESSING et al. (2003) conseguiram identificar os sorotipos 2, 5, e 6 por mPCR, baseado no gene cps específico para cada sorotipo. Enquanto, ZHOU et al. (2008), através de mPCR, amplificaram os genes correspondentes aos sorotipos 3, 6 e 8. Em 2008, também, ANGEN et al.(2008) identificaram os sorotipos 1, 7, e 12 através de mPCR para o gene cps. A combinação das técnicas propostas por JESSING et al. (2003), ZHOU et al. (2008) e ANGEN et al. (2008) não permite distinguir todos os sorotipos de APP, apenas os sorotipos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 12. No entanto, a combinação das técnicas descritas por esses autores e a proposta por RAYAMAJHI et al. (2005) poderia auxiliar na identificação e na diferenciação dos sorotipos de APP.

O objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia visando à diferenciação e à identificação dos 15 sorotipos de APP, utilizando duas técnicas de mPCR, previamente descritas, levando em consideração a limitação da técnica na identificação dos sorotipos 13 e 15. Para tanto, foram incluídas, neste estudo, amostras de referência para cada um dos 15 sorotipos, além de 10 isolados de campo provenientes de animais com sinais clínicos da pleuropneumonia suína. As cepas de referência e os isolados de campo foram gentilmente cedidos do laboratório Microvet (Microbiologia Veterinária Especial LTDA, Viçosa/ MG). A extração do DNA genômico das amostras de referência e dos isolados de campo foi realizada segundo método fenólico descrito por GEBHARDT et al. (1991). Neste trabalho, foram empregados dois mPCRs, sendo: o primeiro visando à amplificação dos genes das exotoxinas e, nos casos em que ocorreu o perfil dos sorotipos não identificáveis 2, 8, 15 ou 12, 13, foi realizado o segundo mPCR para a amplificação dos genes dos antígenos capsulares.

As reações do mPCR (genes das exotoxinas Apxs) foram feitas utilizando *primers* (Figura 1) e as condições estabelecidas por

Primers (5' - 3')	Tamanho do fragmento	Sorotipos															
		1	2	3	4	5a	5b	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>apxIII</b> F- GCAATCAGTCCATTGGCGTT R- GACGAGCATCATAGCCATTC	396pb		+	+	+			+		+							+
<b>apxIA</b> F- ATCGAAGTACATCGCTCGGA R- CGCTAATGCTACGACCGAAC	723pb	+				+	+				+	+	+				+
<b>apxIB</b> F- TTATCGCACTACCGCACTT R- TGCAGTCACCGATTCCACTA	811pb	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>apxII</b> F- GAAGTATGGCGAGAAGAACC R- CGTAACACCAGCAACGATTA	965pb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+
<b>apxIV</b> F- GCGAAACAATTCTGAAGGG R- GGCCATCGACTCAACCAT	1600pb				+						+		+				
	2000pb								+								
	2400pb	+		+										+	+	+	
	2800pb		+			+	+		+	+		+					+

Figura 1 - Perfil de amplificação dos genes apxI, apxII, apxIII e apxIV dos 15 sorotipos de referência de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizando mPCR e as sequências dos *primers* utilizados para amplificação dos genes *apxs*. As caixas de mesma cor indicam os grupos de sorotipos de *A. pleuropneumoniae* não distinguíveis pelo PCR multiplex baseado no perfil de amplificação dos genes *apxs*.

RAYAMAJHI et al. (2005). Na figura 1, estão sumarizados os resultados obtidos. Pode-se observar a limitação dessa técnica, indicando que os sorotipos 2, 8 e 15 apresentam o mesmo perfil de amplificação (identificados em azul), como também os perfis dos sorotipos 12 e 13 (identificados em vermelho). Para esses dois grupos, foi realizado um segundo mPCR, no qual a mistura de reação continha *primers* específicos (0,2µM) para sorotipos 2, 8 e 12 (2F-ACTATGGCAATCAGTCGATTCAT/2R-CCTAATCGGAACGCCATTCTG, 8F-TTAGTTGCGCAAACGGCTTTTGAA/8R-GATTAAGTGGTCCGTCGAAATG e 12F-GGTTCTCCAGATGACTCTGAAA/12R-GCTATTGGATGAAGATGACTCAT) em um volume final da reação de 25µL, seguindo as recomendações do fabricante da enzima Taq polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação da mPCR foram: desnaturação a 95°C 5min<sup>-1</sup>, 30 ciclos: a 94°C 1min<sup>-1</sup>, 62°C 1min<sup>-1</sup>, 72°C 90s<sup>-1</sup>, e uma etapa final a 72°C 3min<sup>-1</sup>. Os produtos dos sorotipos que amplificaram foram visualizados em gel de agarose a 1,5% e foto documentados com câmera digital Olympus C-5060 wide zoom.

A figura 2 apresenta os resultados obtidos na segunda reação. O tamanho dos produtos de amplificação obtido com o segundo mPCR foi 500, 1106 e 559 pares de bases correspondente aos sorotipos 2, 8 e 12, respectivamente. A identificação dos sorotipos

13 e 15 foi sugerida por exclusão, visto que não há amplificação desses dois sorotipos na 2ª reação.

No primeiro mPCR, seis amostras não foram distinguíveis entre os grupos 2, 8 e 15 e quatro amostras entre os sorogrupos 12 e 13. Entre as seis amostras classificadas como sorotipo 2, 8 e 15, duas foram identificadas como sorotipo 2, duas como sorotipo 8 e duas como sorotipo 15. Dentre as quatro amostras do grupo 12 e 13, duas foram classificadas como sorotipo 12 e duas, como sorotipo 13, pela utilização do segundo mPCR (Figura 2). A especificidade do método foi comprovada utilizando as amostras de referência para os sorotipos 2, 8 e 12.

Ferramentas moleculares são extensivamente aplicadas por serem técnicas factíveis por diversos laboratórios e fornecem resultados rápidos. As metodologias propostas para mPCR possibilitaram a identificação dos sorotipos das amostras de referência e de amostras de campo. A combinação de metodologias permitiu o diagnóstico eficaz dos sorotipos de APP nas amostras analisadas, e poderá ser útil em estudos futuros de ocorrência de sorotipos em regiões produtoras de suínos. A sorotipagem correta e rápida das amostras de campo contribuirá no conhecimento dos isolados circulantes e no emprego de alternativas como possíveis indutores da imunidade em rebanhos acometidos pela pleuropneumonia suína.

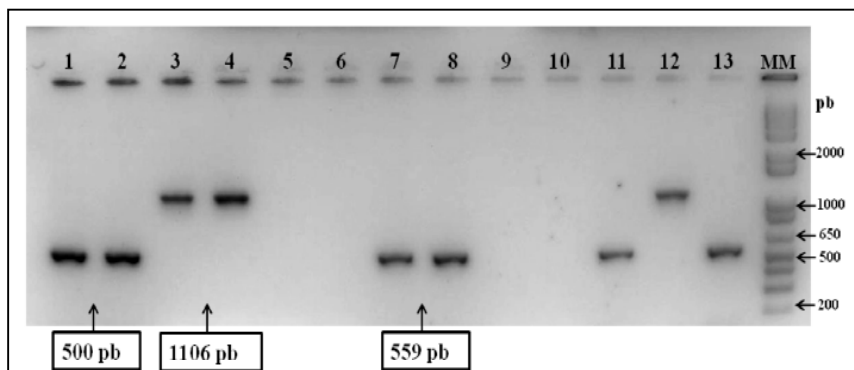


Figura 2 - Análise eletroforética, em gel de agarose 1,5%, das amostras de campo dos grupos dos sorotipos 2, 8 e 15 e 12 e 13 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando a segunda reação de mPCR. 1 a 6: amostras de campo de *A. pleuropneumoniae* do grupo 2, 8 e 15, sendo que, nas colunas 1 e 2, estão as amostras pertencentes ao sorotipo 2, nas colunas 3 e 4, as amostras pertencentes ao sorotipo 8 e nas colunas 5 e 6, as amostras foram identificadas como sorotipo 15, por exclusão. 7 a 10: amostras de campo de *A. pleuropneumoniae* do grupo 12 e 13. Nas colunas 7 e 8, as amostras pertencentes ao sorotipo 12 e, nas colunas 9 e 10, as amostras identificadas como sorotipo 13, por exclusão. 11: amostra de referência de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 2. 12: amostra de referência de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8. 13: amostra de referência de APP sorotipo 12. MM: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). pb: pares de bases.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro, e ao laboratório Microvet, pelo fornecimento dos isolados de campo.

## REFERÊNCIAS

- ANGEN, O. et al. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.312-318, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508001922>>. Acesso em: 02 mar. 2011. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.010.
- BECK, M. et al. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2749-2754, 1994. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/32/11/2749>. Acesso em: 15 mar. 2011.
- BLACKALL, P.J. et al. Proposal of new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. **Veterinary Microbiology**, v.84, p.47-52, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350100428X>>. Acesso em: 15 mar. 2011. doi:10.1016/S0378-1135(01)00428-X.
- CHIERS, K. et al. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**, v.41, n.5, p.65, 2010. Disponível em: <[http://www.vetres.org/index.php?Option=com\\_article&access=doi&doi=10.1051/vetres/2010037&Itemid=129](http://www.vetres.org/index.php?Option=com_article&access=doi&doi=10.1051/vetres/2010037&Itemid=129)>. Acesso em: 01 mar. 2011. doi: 10.1051/vetres/2010037.
- GEBHARDT, C.J. et al. Cloned DNA probes for the intracellular campylobacter-like organism of porcine proliferative enteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.5, p.1011-1051, 1991. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/29/5/1011>>. Acesso em: 20 mar. 2011.
- JESSING, S.G. et al. Evaluation of a Multiplex PCR Test for Simultaneous Identification and Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 2, 5, and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9, p.4095-4100, 2003. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/41/9/4095>>. Acesso em: 05 mar. 2011. doi: 10.1128/JCM.41.9.4095-4100.2003.
- MUÑOZ, A.M. **Expresión Recombinante em *E. coli* de antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para vacinação y diagnóstico**. 2003. 129f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha.
- RAYAMAJHI, N. et al. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.4, p.359-362, 2005. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/content/17/4/359.abstract>>. Acesso em: 20 dez. 2010. doi: 10.1177/104063870501700410.
- ZHOU, S.C.P. et al. Multiplex PCR that can distinguish between Immunologically Cross-Reactive Serovar 3, 6 and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.2, p.800-803, 2008. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/46/2/800.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2011. doi: 10.1128/JCM.01787-07.