

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

DETECÇÃO DIRETA DE *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* EM ÓRGÃOS DE SUÍDEOS DO ESTADO DE SÃO PAULO PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (*NESTED-PCR*)

M.I.C.P. Ferraz, D.R. Ferreira, A.C. Goes, F. Gregori, S. Miyashiro, V.L.A. Ruiz

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: leticie@biologico.sp.gov.br

RESUMO

A pleuropneumonia suína, causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, é uma importante doença respiratória, responsável por prejuízos e queda de produtividade nas criações. Este trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de *A. pleuropneumoniae* em amostras de campo, mediante a adaptação e emprego de uma técnica de *nested-PCR* dirigida ao gene Apx IV. Definiu-se a sensibilidade analítica das técnicas de PCR e *nested-PCR* utilizando a amostra padrão *A. pleuropneumoniae* sorotipo III, em concentrações de DNA variando entre 30 µg/mL a 0,01 ng/mL. Um total de trinta e sete amostras de campo encaminhadas ao Instituto Biológico entre 1995 a 2007 foram analisadas pelas técnicas de PCR e *nested-PCR*. A avaliação da sensibilidade analítica revelou que a PCR possui capacidade de gerar sinal a partir de 2 ng/mL de DNA extraído e a *nested-PCR* a partir de 0,4 ng/mL. Uma vez que a *nested-PCR* apresentou sensibilidade analítica cinco vezes maior se comparada à PCR para detecção de *A. pleuropneumoniae* em amostra padrão, o seu emprego pode minimizar a ocorrência de resultados tipo “falso-negativo”. Dentre as amostras testadas, dez foram positivas à *nested-PCR*, sendo observada a ocorrência de *A. pleuropneumoniae* em nove diferentes animais, um deles javali. A presente técnica de *nested-PCR* pode ser utilizada para detecção direta de *A. pleuropneumoniae* em amostras de campo, mesmo após congelamento da amostra por longos períodos e sem necessidade de isolamento bacteriano prévio.

PALAVRAS-CHAVE: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia suína, reacção em cadeia pela polimerase (PCR), *nested-PCR*.

ABSTRACT

DIRECT DETECTION OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* IN SUIDAE ORGANS IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL, BY POLYMERASE CHAIN REACTION (NESTED-PCR). Porcine pleuropneumonia, caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, is an important respiratory disease, responsible for economic losses and reduced productivity. The aim of this study was to determine occurrence of *A. pleuropneumoniae* in field samples, using an adapted nested-PCR reaction targeting the Apx IV gene. Different DNA concentrations (from 30 µg/mL to 0.01 ng/mL) of *A. pleuropneumoniae* serotype III reference strain were used to determine the level of sensitivity of first generation and nested-PCR reactions. Thirty-seven field samples sent to Instituto Biológico from 1995 to 2007 were tested by PCR and nested-PCR. Determination of the level of sensitivity showed that PCR could amplify to 2 ng/mL of extracted DNA and nested-PCR to 0.4 ng/mL. Since the nested reaction exhibited a level of sensitivity 5 times greater than the PCR reaction to detect a reference strain, using nested-PCR could minimize the occurrence of false-negative results. Among tested samples, 10 of them were nested-PCR positive, showing occurrence of *A. pleuropneumoniae* in 9 different animals (including one wild boar). This nested-PCR reaction can be used for direct detection of *A. pleuropneumoniae* in field samples, even after frozen storage for long periods, without the need for previous bacterial isolation.

KEY WORDS: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porcine pleuropneumonia, polymerase chain reaction (PCR), nested-PCR.

O *Actinobacillus pleuropneumoniae* é um cocobacilo Gram negativo classificado em dois biovars e quinze sorotipos, definidos pela produção de uma ou mais toxinas do grupo RTXs (*repeat in toxin*), sendo elas

Apx I, Apx II e Apx III. A toxina Apx I tem ação hemolítica e citotóxica, a Apx II é citotóxica e tem baixa atividade hemolítica e a Apx III possui apenas a atividade citotóxica (CHRISTENSEN; BISGAARD, 2004).

SCHALLER *et al.* (1999) descreveram o gene Apx IV, que codifica a toxina RTXIV, de baixa atividade hemolítica, comum a todos os sorotipos.

O *A. pleuropneumoniae* está envolvido na ocorrência da pleuropneumonia suína, caracterizada por dificuldade respiratória, febre, depressão, tosse, mortalidade e morbidade variáveis, além de gastos com medicamentos e possíveis condenações de carcaças. Acredita-se que suínos de todas as idades sejam susceptíveis, porém os surtos ocorrem geralmente naqueles entre setenta e cem dias de idade. Após essa fase, segue-se a forma crônica, afetando principalmente os animais na terminação (SOBESTIANSKY *et al.*, 1998).

O agente pode localizar-se nas tonsilas, em abscessos e nódulos pulmonares dos suínos, transformando-os em portadores assintomáticos. Fêmeas infectadas ou vacinadas desenvolvem imunidade sorotipo específica que, por meio do colostro, protege seus leitões nas primeiras semanas de vida (BERSANO *et al.*, 2003).

O primeiro relato da infecção ocorreu em 1959 no norte da Califórnia, enquanto que, no Brasil, a primeira descrição foi em Santa Catarina em 1981. Desde então, o agente tem sido identificado com certa frequência mediante diferentes metodologias, viabilizando a sorotipagem eficiente, rápida, de fácil execução e baixo custo (BERSANO *et al.*, 2003).

PIFFER *et al.* (1985), analisando amostras de pulmão e cavidade nasal de suínos no sul do Brasil, por meio das técnicas de imunoeletroforese, imunofluorescência e imunodifusão, identificaram os sorotipos 3 e 5.

Durante o período de 1985 a 1987, SAITO *et al.* (1988), examinando cavidade nasal e pulmão de setenta e dois suínos, de diferentes idades e com sintomas clínicos de pleuropneumonia, provenientes de dez estados brasileiros, isolaram trinta e três cepas de *A. pleuropneumoniae*. Os sorotipos identificados pela soroaglutinação rápida em placa foram 1, 3, 4 e 5. A existência de novos sorotipos e o grande número de amostras de *A. pleuropneumoniae* não tipadas levaram PIFFER *et al.* (1995) a analisar, por imunodifusão e hemaglutinação passiva, cinquenta e duas amostras originárias de diferentes regiões do Brasil, ocasião na qual observaram tratar-se dos sorotipos 1, 3, 7, 9,

sendo a primeira identificação dos sorotipos 7 e 9 no país.

O *A. pleuropneumoniae* tem sido detectado por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) por diversos autores, tendo como vantagem em relação ao isolamento bacteriano, a possibilidade de amplificar material genético de amostras não viáveis biologicamente, o que minimiza resultados "falso-negativos". Nesse sentido, BACCARO *et al.* (1999) submeteram fragmentos de pulmão de seis suínos a essa prova e observaram que dois desses materiais foram positivos, tanto no isolamento como na PCR. Na mesma ocasião também aplicaram a técnica em sessenta e oito suabes de tonsilas de suínos com idade entre cinquenta dias e um ano, demonstrando resultado positivo em vinte e uma dessas amostras.

Segundo FONSECA *et al.* (1999), KLEIN *et al.* (1999), COLLARES *et al.* (1999) e COSTA *et al.* (2004), a PCR tem se mostrado de grande utilidade, tendo entre outras vantagens a de otimizar estratégias de isolamento bacteriano, aumentando as possibilidades de detecção do agente e agilizar o diagnóstico, uma vez que pode substituir as provas bioquímicas para a caracterização do agente.

O diagnóstico do *A. pleuropneumoniae* é uma etapa fundamental para o estabelecimento de ações preventivas nos rebanhos e, nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de *A. pleuropneumoniae* em amostras de campo, mediante a adaptação e emprego de uma técnica de *nested-PCR* direcionada ao gene Apx IV, sem isolamento bacteriano prévio.

A amostra padrão *A. pleuropneumoniae* sorotipo III liofilizada teve seu DNA extraído mediante fervura em água ultrapura por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a quantificação do material em espectrofotômetro a 260 nm (CASTRO *et al.*, 2002) e diluições em concentrações variáveis entre 30 a 0,1 ng/mL de DNA foram empregadas para determinação da sensibilidade analítica das reações de PCR, visando amplificar um fragmento de 442 pares de bases (pb) de parte do gene Apx IV, e *nested-PCR* (com alteração da temperatura de hibridização dos *primers* de 52° C para 54,3° C), amplificando um fragmento interno ao anterior, de 378 pb.

Tabela 1 – Descrição da sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested-PCR* para detecção de DNA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. São Paulo, 2007.

Nome	Sequência	Localização	Tamanho fragmento	Referência
ApxIVA-1L	5'- TGGCACTGACGGTGATGA - 3'	6018-6035	442 pb	SCHALLER <i>et al.</i> , 1999
ApxIVA-1R	5'- GGCCATCGACTCAACCAT - 3'	6442-6459		
ApxIVA-1R-nest	5'- GGGGACGTAACCTCGGTGATT - 3'	6407-6427	378 pb	SCHALLER <i>et al.</i> , 2001
ApxIVA-L-nest	5'- GCTCACCAACGTTTGTCAT - 3'	6050-6064		

Para os cálculos de sensibilidade analítica, foi utilizada a sequência completa do genoma de *A. pleuropneumoniae* sorotipo III depositada no GenBank® (NCBI Reference Sequence NC_010278), determinando a massa do DNA genômico com auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor®, versão 7.0.5.3 (HALL, 1999).

A solução de reagentes da PCR foi modificada e consistiu-se de: 0,25 µM de *primers* ApxIV-1L e ApxIV-1R (Tabela 1); 1,0 U/µL de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen®); 0,17 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; 20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl; 2,5 µL de DNA extraído e água ultrapura q.s.p. 25 µL. Os ciclos de temperatura foram de 94° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, encerrando com aquecimento de 72° C por 10 minutos para a extensão final (SCHALLER *et al.*, 1999). A solução de reagentes da reação de *nested-PCR* foi idêntica à reação supracitada, substituindo-se apenas o par de *primers*, sendo agora empregados ApxIV-1L-neste ApxIV-1R-nest (Tabela 1) (SCHALLER *et al.*, 2001) e submetida a 94° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 54,3° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, encerrando com aquecimento de 72° C por 10 minutos para a extensão final (FERRAZ *et al.*, 2006). Os produtos amplificados foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo a 0,5 mg/mL. Os fragmentos amplificados foram comparados a padrão de tamanho molecular (100 bp DNA Ladder BioLabs®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

Uma vez definida a sensibilidade analítica das técnicas, estas foram empregadas para a detecção direta de *A. pleuropneumoniae* a partir de um painel de 37 amostras de campo (provenientes de 33 suínos e 1 javali) oriundas de diversas criações do Estado de São Paulo, encaminhadas ao Instituto Biológico entre os anos de 1995 e 2007. Tais amostras consistiam em macerados de pulmão (n = 13), de tonsilas (n = 7) e *pools* que continham pulmão e tonsilas, além de outros órgãos (n = 17), sendo realizada a extração do material genético mediante o emprego do reagente DNAzol (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante.

As técnicas de PCR e *nested-PCR* apresentaram o sinal esperado, demonstrando respectivamente produtos amplificados de 442 e 378 pb.

Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade analítica mostraram que ambas as reações possuem capacidade de gerar sinal a partir de quantias reduzidas de material genético quando trabalhamos com culturas puras da bactéria, alcançando o limiar de 2 ng/mL para a reação de PCR e 0,4 ng/mL para a *nested-PCR* (Fig. 1), que em massa equivaleria respectivamente a 5 pg de DNA na PCR e 0,1 pg na *nested-PCR*. Sabendo-se que a massa aproximada de DNA genômico de uma unidade de *A. pleuropneumoniae* (de

acordo com a sequência NC_010278) é 2,3 fg, a reação de *nested-PCR* pode detectar o DNA equivalente a pouco mais de 40 bactérias.

Das trinta e sete amostras testadas, não houve sinal detectável na PCR, porém, dez delas foram positivas à *nested-PCR*, oriundas de diferentes materiais clínicos (pulmão n = 3; tonsila n = 3; *pool* de órgãos n = 4), representando nove animais, dos quais um era javali (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados obtidos a partir da reação de *nested-PCR* das amostras de diferentes órgãos de suídeos. São Paulo, 2007.

Ano de colheita	Órgão	<i>Nested-PCR</i>
45/1995	<i>pool</i>	negativo
62/1998	<i>pool</i>	negativo
89/1998	tonsila	negativo
90/1998	tonsila	negativo
91/1998	tonsila	negativo
97/1998	tonsila	positivo
136/1998	<i>pool</i>	negativo
58/2000	pulmão	positivo
120/2000	pulmão	negativo
129/2001	tonsila	negativo
99/2002	pulmão	positivo
39/2002	pulmão	negativo
105/2002	pulmão	negativo
73/2003	pulmão	negativo
102/2003	<i>pool</i>	negativo
114/2003	<i>pool</i>	negativo
140/2003	tonsila	positivo
140/2003	pulmão	negativo
49/2004 A	<i>pool</i>	negativo
49/2004 B	<i>pool</i>	negativo
12/2005	pulmão	positivo
60/2005	<i>pool</i>	negativo
62/2005	<i>pool</i>	negativo
65/2005	<i>pool</i>	negativo
68/2005	<i>pool</i>	negativo
73/2005	pulmão	negativo
99/2005	<i>pool</i>	positivo
103/2005	<i>pool</i>	positivo
109/2005	<i>pool</i>	negativo
111/2005	<i>pool</i>	negativo
119/2005	pulmão	negativo
131/2005	pulmão	negativo
132/2005	pulmão	negativo
50/2006	<i>pool</i>	positivo
17/2007	pulmão	negativo
17/2007	tonsila	positivo
17/2007	<i>pool</i>	positivo
Total	37	10

Nota: a amostra 17/2007 é proveniente de javali

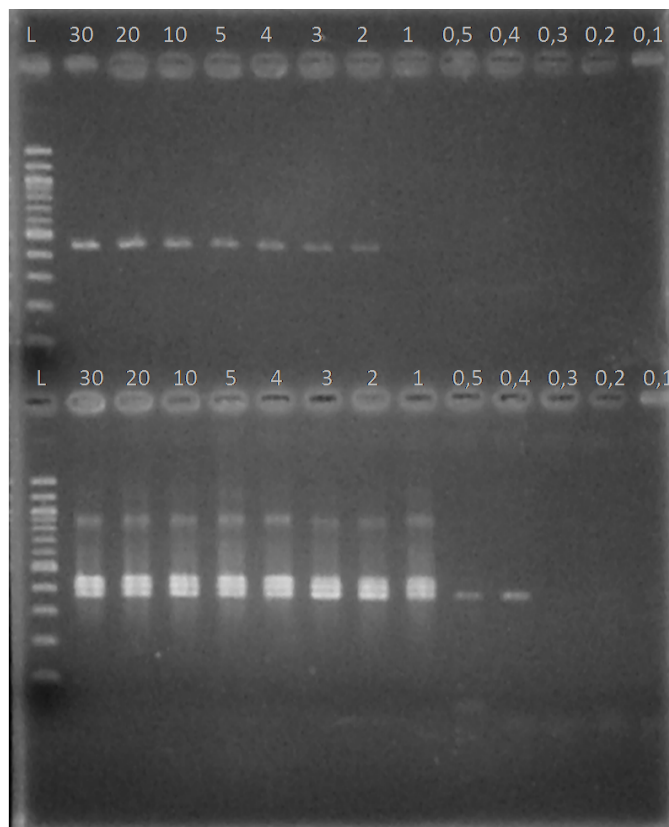


Fig. 1 – Reprodução de gel de eletroforese com resultado do teste de sensibilidade analítica das reações de PCR (acima) e *nested-PCR* (abaixo) para *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo III. São Paulo, 2007. Nota: Os números acima das canaletas representam as concentrações de DNA empregadas nas reações em ng/mL. Pode-se observar o padrão de tamanho molecular de 100 pb (L) e a presença de fragmentos de 442 pb até a concentração 2,0 µg/mL para PCR e 378 pb até a concentração de 0,4 µg/mL para *nested-PCR*.

As técnicas de PCR e *nested-PCR* adaptadas a partir dos trabalhos de SCHALLER *et al.* (1999, 2001) e FERRAZ *et al.* (2006) apresentaram sinal correspondente ao esperado, demonstrando respectivamente 442 e 378 pares de bases em seus produtos amplificados. Cabe ressaltar que a presença de fragmentos intermediários com 410 pb (Fig. 1) é resultado da hibridização de *primers* restantes da PCR em combinação com os da *nested-PCR*, deixando claro não ser uma amplificação inespecífica apresentada pela reação.

A sensibilidade analítica de ambas as técnicas foi determinada com base em diluição de material genético extraído a partir de amostra padrão (bactéria liofilizada, *A. pleuropneumoniae* sorotipo III), o qual foi dosado por espectrofotometria. Os resultados obtidos mostram que ambas as reações possuem capacidade de gerar sinal a partir de quantias mínimas de material genético quando trabalhamos com culturas puras da bactéria, alcançando o limiar de 2 ng/mL para a reação de PCR e 0,4 ng/mL para a *nested-PCR*, que em massa equivaleria respectivamente a adição de 5 pg de DNA na PCR e 0,1 pg na *nested-PCR*, ou ainda o equivalente a 40 bactérias na última reação.

Portanto, demonstrou-se que a *nested-PCR* é capaz de evidenciar sinal a partir de uma quantidade cinco vezes menor de material do que aquela presente na PCR, o que é particularmente relevante quando a reação é feita a partir de amostras de campo, nas quais a concentração bacteriana pode estar reduzida e a viabilidade do DNA comprometida. Uma decorrência de se aliar a *nested-PCR* neste contexto foi a minimização da ocorrência de resultados do tipo falso-negativos que seriam gerados se apenas a reação de PCR tivesse sido aplicada, deixando evidente que o aumento da sensibilidade analítica da técnica aumentou também a sua sensibilidade diagnóstica. Com efeito, todas as trinta e sete amostras de campo testadas pela PCR apresentaram resultado negativo, porém, quando submetidas à *nested-PCR*, dez delas mostraram-se positivas.

Aparentemente, o tipo de órgão do qual se fez a extração de material genético não influenciou no resultado do teste, visto que dentre as dez amostras positivas, quatro delas eram *pool* de órgãos, três foram obtidas a partir de pulmão e outras três de tonsilas. Deste modo o teste mostrou-se versátil quanto ao emprego de diferentes materiais clínicos.

Outra observação importante é em relação às amostras 140/2003 e 17/2007, que tiveram material genético extraído tanto de pulmão quanto de tonsila, porém, apresentando resultado positivo apenas para tonsilas. Isso pode indicar que a infecção estava sendo controlada na porta de entrada (tonsilas) ou que estava evoluindo, mas ainda não havia atingido os pulmões. Além disso, o material de *pool* de órgãos da amostra 17/2007 também foi testado, apresentando resultado positivo e demonstrando que, apesar da amostra de tonsila ter sido diluída junto a outros órgãos, isso não afetou o resultado, além de que o material desses órgãos não se mostrou inibidor para a amplificação.

A enfermidade tem sido controlada por meio da vacinação, que impede a mortalidade, mas não a infecção, conferindo ainda, uma imunidade soro-específica. A erradicação da enfermidade num plantel fica dificultada pela presença dos portadores, recomendando-se a eliminação do rebanho e a repopulação com animais livres (BERSANO *et al.*, 2003), o que denota a importância de se identificar a circulação do agente nas criações.

A sensibilidade analítica (limiar de detecção) da *nested-PCR* foi cinco vezes maior se comparada a PCR para detecção de *A. pleuropneumoniae* em amostra padrão. A técnica de *nested-PCR* pode ser utilizada para detecção direta de *A. pleuropneumoniae* em amostras de campo, mesmo após congelamento da amostra por longos períodos e sem necessidade de isolamento bacteriano prévio. Foi observada a ocorrência de *A. pleuropneumoniae* em nove diferentes animais, sendo um deles javali, oriundos de diferentes criações localizadas no Estado de São Paulo.

Ao se considerar que o *A. pleuropneumoniae* apresenta crescimento fastidioso ao isolamento e que foi possível detectar o *A. pleuropneumoniae* em amostras de diferentes órgãos, armazenadas em freezer comum (-20° C) por longos períodos, esta prova constitui-se numa alternativa ao diagnóstico direto deste agente.

AGRADECIMENTOS

- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Iniciação Científica à Maria Isabel Camargo Pinto Ferraz;
- à Empresa Irfa Química e Biotecnologia Industrial Ltda, pelo fornecimento da amostra padrão *A. pleuropneumoniae* sorotipo III liofilizada.

REFERÊNCIAS

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M. Detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae* através da reação em cadeia pela polimerase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte, MG. *Resumos*. Belo Horizonte, 1999. p.149.

BERSANO, J.G.; VILLALOBOS, E.M.C.; MONTEIRO, R.M. Prevalência do *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* em suínos no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, n.2, p.251-253, 2003.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; RUIZ, V.L.A.; LEOMIL, H.; RICHTZENHAIN, L.J. Padronização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do Circovírus Porcino tipo 1 (PCV-1) e 2 (PCV-2) em amostras clínicas. *Arquivos do Instituto Biológico São Paulo*, v.69. p.34, 2002. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 15., 2002, São Paulo. Resumo 020.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. Revised definition of *Actinobacillus* sensu stricto isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.13-30, 2004.

COLLARES, R.M.; FRAZZON, A.P.; PIFFER, I.A.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S.; SILVA, S.C. Identificação por PCR dos genes para toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em isolados de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte, MG. *Resumos*. Belo Horizonte, 1999. p.147-148.

COSTA, M.M.; BALESTRIN, R.; SCHRANK, A.; PIFFER, I.A.; SILVA, S.C.; SCHRANK, I.S. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Current Microbiology*, v.48, n.3, p.189-195, 2004.

FERRAZ, M.I.C.P.; BERSANO, J.G.; CARVALHO, A.F.; FREITAS, C.M.; GÓES, A.C.; GREGORI, F.; MIYASHIRO, S.; OGATA, R.A.; RUIZ, V.L.A. Padronização e implementação de teste diagnóstico para detecção direta de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS, 4., 2006, São Paulo, SP. *Anais*. São Paulo, 2006. 1 CD-ROM

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

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98, 1999.

KLEIN, C.S.; SCHRANK, A.; SILVA, S.C.; PIFFER, I.A.; SCHRANK, I.S. Caracterização de genes envolvidos no transporte de cápsulas de App: Aplicação da técnica de PCR para amostras de campo NAD-dependentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS

ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte, MG. *Resumos*, Belo Horizonte, 1999. p.151-152.

PIFFER, I.A.; CARTER, G.R.; BOTVCHENCO A.A.F. Identificação de sorotipos de *Haemophilus pleuropneumoniae* através da técnica de IEOF. In: CONGRESSO LATINO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1., 1985, Rio de Janeiro, RJ. *Resumos*. Rio de Janeiro, 1985. p.97.

PIFFER, I.A.; KLEIN, C.S.; FÁVERO, M.B.B.; FIGUEIREDO, J. Sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* prevalentes no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1995, Blumenau, SC. *Resumos*. Blumenau, 1995. p.77.

SAITO, K.; LIMA, R.A.T.; APOLLARO, R.; MORO, L.P.; OLIVEIRA, F.D.E. Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* (HPN) from nasal cavities or lungs of pigs. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 10., 1988, Rio de Janeiro, RJ. *Resumos*. Rio de Janeiro, 1988. p.73.

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

SCHALLER, A.; KUHN, R.; KUHNERT, P.; NICOLET, J.; ANDERSON, T.J.; MACINNES, J.I.; SEGERS, R.P.A.M.; FREY, J. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Veterinary Microbiology*, v.79, p 47-62, 2001.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S.J.; CARVALHO, L.F.O.S.; MORENO, A.M., ROEHE, P.M. Pleuropneumonia In: _____ . *Clínica e patologia suína*. 2.ed. Goiânia: Gráfica Art3, 1998. p.353-358.

Recebido em 11/1/08

Aceito em 17/11/09