CRISTINA ROMÁN AMIGO

**Desenvolvimento da reação em cadeia pela
polimerase para detecção de
Actinobaculum suis e caracterização fenotípica e
genotípica dos isolados**

**São Paulo
2012**

CRISTINA ROMÁN AMIGO

**Desenvolvimento da reação em cadeia pela
polimerase para detecção de
Actinobaculum suis e caracterização fenotípica e
genotípica dos isolados**

**São Paulo
2012**

CRISTINA ROMÁN AMIGO

**Desenvolvimento da reação em cadeia pela
polimerase para detecção de
Actinobaculum suis e caracterização fenotípica e
genotípica dos isolados**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Epidemiologia
Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientadora:

Professora Doutora Andrea Micke Moreno

**São Paulo
2012**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2627
FMVZ

Amigo, Cristina Román

Desenvolvimento da reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Actinobaculum suis* e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados / Cristina Román Amigo. -- 2012.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Actinobaculum suis. 2. Infecção urinária. 3. PCR. 4. Susceptibilidade antimicrobiana. 5. AFLP. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Actinobaculum suis*", protocolado sob o nº 2412/2011, utilizando 250 (duzentos e cinquenta) suínos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 7/12/2011.

We certify that the Research "Development of polymerase chain reaction (PCR) to *Actinobaculum suis* detection", protocol number 2412/2011, utilizing 250 (two hundred fifty) pigs, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/7/2011.

São Paulo, 8 de dezembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AMIGO, Cristina Román

Título: Desenvolvimento da reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Actinobaculum suis* e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por me ensinarem o valor do estudo e
ao Danilo por me ajudar nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Doutora Andrea Micke Moreno pela amizade, apoio e enorme aprendizado.

À Professora Doutora Terezinha Knöbl pela atenção gentilmente dispensada durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Filomena e Ricardo (in memorian), e os meus irmãos, Carolina e Ricardo, que sempre me incentivaram e a quem devo o que sou hoje.

À minha Nonna Nita, à minha tia Enza e ao Hadji, que estão sempre por perto me acolhendo nos momentos difíceis e me apoiando nas minhas decisões.

Ao Danilo, por todos esses anos de amor, companheirismo, dedicação e principalmente paciência!

Aos amigos do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

Aos proprietários e funcionários das granjas onde foram realizadas as coletas pela ajuda e acolhimento incondicionais.

Às companheiras do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia FMVZ/USP e ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão pela disponibilidade e auxílio na realização deste trabalho.

Aos alunos, professores e funcionários do VPS/FMVZ/USP pelas risadas, conversas e convivência.

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

(Sarah Westphal Batista da Silva)

RESUMO

AMIGO, C. R. **Desenvolvimento da reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Actinobaculum suis* e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados.** [Development of polymerase chain reaction for *Actinobaculum suis* detection and phenotypic and genotypic characterization of isolates]. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O *Actinobaculum suis* é um dos principais micro-organismos relacionados a infecções de trato urinário em fêmeas suínas. As características de crescimento deste agente dificultam o isolamento bacteriano tradicional, o que pode tornar a sua prevalência subestimada. Este estudo teve por objetivos desenvolver a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do *A. suis*, avaliar a sensibilidade e especificidade desta técnica e comparar seu desempenho com o isolamento bacteriano. Além disso, as cepas isoladas foram caracterizadas através do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e submetidas à determinação da concentração inibitória mínima para caracterização dos perfis de susceptibilidade antimicrobiana. Foram analisados 45 suabes prepuciais de machos e 192 urinas de fêmeas suínas provenientes de três granjas. Os resultados indicaram que a PCR desenvolvida foi específica para o *A. suis* e apresentou limiar de detecção entre $1,0 \times 10^1$ UF/mL e $1,0 \times 10^2$ UFC/mL. A frequência de *A. suis* encontrada através da PCR foi de 82,2% (37/45) nos suabes prepuciais e de 8,9% (17/192) nas urinas de fêmeas. No que se refere ao isolamento, nenhuma das amostras de urina foi positiva para o agente, enquanto 31,1% (14/45) dos suabes foram positivos. A partir das amostras positivas isoladas dos suabes prepuciais foram selecionadas 20 cepas de *A. suis*. Os perfis de susceptibilidade entre estas cepas foram semelhantes, no entanto diferiram dos isolados utilizados como controle e provenientes de uma fêmea com infecção urinária. A técnica de PCR foi mais eficiente que o isolamento na identificação de amostras positivas para *A. suis*. Através do AFLP com uma única enzima foi possível caracterizar todos os isolados e relacionar os dados obtidos com a origem das cepas e o perfil de resistência. Até o presente não há relatos na literatura de caracterização genotípica de *A. suis* através do AFLP ou detecção do agente através da PCR.

Palavras-chave: *Actinobaculum suis*. Infecção urinária. PCR. Susceptibilidade antimicrobiana. AFLP.

ABSTRACT

AMIGO, C. R. **Development of polymerase chain reaction for *Actinobaculum suis* detection and phenotypic and genotypic characterization of isolates.** [Desenvolvimento da reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Actinobaculum suis* e caracterização fenotípica e genotípica dos isolados]. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Actinobaculum suis is an important agent related to urinary infection in swine females. The growth characteristics of this agent hamper the traditional bacterial isolation, which can make their prevalence underestimated. The purpose of this study was to develop the polymerase chain reaction (PCR) for *Actinobaculum suis* detection, to evaluate the sensitivity and specificity of this technique and compare the results with bacterial isolation. Moreover, the isolates were characterized by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and subjected to determination of minimum inhibitory concentration for characterization of the antimicrobial susceptibility profiles. Forty-five preputial swabs from boars and a hundred and ninety-two urine samples from sows of three herds were analyzed. The results indicate that the developed PCR was specific for *A. suis*, presenting a limit detection between 1.0×10^1 UFC/ml and 1.0×10^2 UFC/ml. *A.suis* frequency by PCR was 82.2% (37/45) in male preputial swabs and 8.9% (17/192) in females urine. Through traditional isolation, none of the urine samples were positive, while *A.suis* growing was observed in 31.1% (14/45) of the swabs. From the positive samples of the preputial swabs were selected 20 *A.suis* strains. The susceptibility profiles among these strains were similar, but differed from the female isolates used as control. The PCR technique was more effective than isolation for the *A.suis* detection. The AFLP with a single enzyme was able to characterize all isolates and relate the data obtained with the strains origin and resistance profile. Until present, there are no reports of genotypic characterization of *A. suis* strains through AFLP or agent detection by PCR.

Key words: *Actinobaculum suis*. Urinary infection. PCR. Antimicrobial susceptibility. AFLP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Árvore filogenética mostrando a relação do gênero <i>Actinobaculum</i> sp com outros gêneros.....	17
Figura 2	-	Escala para classificação das urinas quanto à cor: incolor, amarelo clara, amarelo escura e avermelhada.....	21
Figura 3	-	Escala para classificação das urinas quanto ao aspecto: límpida e turva.....	21
Figura 4	-	Lesões macroscópicas em bexiga de fêmea suína compatíveis com infecção por <i>Actinobaculum suis</i> : parede espessada e mucosa com superfície hemorrágica e purulenta.....	22
Figura 5	-	Lesões em trato urinário compatíveis com infecção por <i>Actinobaculum suis</i> : rins dilatados e paredes da bexiga e ureteres espessados.....	23
Figura 6	-	Colônias de <i>Actinobaculum suis</i> em ágar sangue após 72 horas de incubação em anaerobiose.....	24
Figura 7	-	<i>Actinobaculum suis</i> com fluorescência evidente e brilhante observada em esfregaço feito a partir de material colhido do divertículo prepucial.....	25
Figura 8	-	Limite de detecção da PCR para <i>Actinobaculum suis</i>	39
Figura 9	-	Dendograma ilustrando os resultados obtidos a partir da análise de cepas de <i>Actinobaculum suis</i> isoladas de fêmeas e machos suínos do Estado de São Paulo, Brasil.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Principais características bioquímicas do <i>A.suis</i>	18
Quadro 2	- Sequências dos <i>primers</i> utilizados na PCR para detecção de <i>A. suis</i>	34
Quadro 3	- Espécies bacterianas utilizadas para testar a especificidade analítica da PCR para <i>A.suis</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Critérios utilizados para interpretação dos perfis de susceptibilidade antimicrobiana.....	32
Tabela 2	- Verificação de sequencias similares às obtidas através do BlastN.....	40
Tabela 3	- Resultados da PCR e do isolamento para detecção de <i>A. suis</i> em suabes prepuciais de suínos e amostras de urina.....	40
Tabela 4	- Ocorrência de <i>A.suis</i> e/ou outros agentes bacterianos nas 192 amostras de urina.....	41
Tabela 5	- Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 23 isolados de <i>A. suis</i> testados.....	42
Tabela 6	- Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos testados frente as 23 cepas <i>A.suis</i> e valores de CIM 50 e CIM 90.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Nomenclatura e taxonomia	16
2.2 Morfologia, metabolismo e perfil bioquímico	17
2.3 Epidemiologia	18
2.4 Patogenia	19
2.5 Sinais clínicos	20
2.6 Lesões	21
2.7 Diagnóstico	23
2.7.1 Isolamento em placa	24
2.7.2 Detecção através de imunofluorescência indireta	25
2.7.3 Detecção através da reação em cadeia pela polimerase	26
2.8 Controle e tratamento	26
2.9 Caracterização genotípica	27
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Amostras	30
4.2 Coleta das amostras	30
4.3 Exame bacteriológico	31
4.4 Susceptibilidade antimicrobiana	31
4.5 Reação em cadeia pela polimerase	32
4.5.1 Extração do DNA bacteriano	32
4.5.2 Desenho dos <i>primers</i> Acs1 e Acs2	33
4.5.3 Amplificação do DNA	34
4.5.4 Avaliação do limite de detecção da PCR (sensibilidade analítica)	34
4.5.5 Avaliação da especificidade da PCR	35
4.5.6 Detecção do produto de amplificação (amplicon)	36
4.6 Sequenciamento	36
4.7 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados	37
4.8 Análises estatísticas	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Reação em cadeia pela polimerase	39
5.2 Comparação entre métodos de detecção de <i>A.suis</i>	40
5.3 Ocorrência de <i>A.suis</i> e outros agentes bacterianos	41
5.4 Susceptibilidade antimicrobiana	41

5.5 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados	44
6 DISCUSSÃO	46
6.1 Reação em cadeia pela polimerase	46
6.2 Comparação entre Métodos de Detecção de <i>A.suis</i>	47
6.3 Ocorrência de <i>A.suis</i> e outros agentes bacterianos	48
6.4 Susceptibilidade antimicrobiana	49
6.5 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados	50
7 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As infecções de trato urinário (ITU) são consideradas uma das doenças mais importantes das matrizes suínas devido à sua estreita relação com problemas reprodutivos como redução do tamanho da leitegada, aumento na taxa de retorno ao cio, descarga vulvar, aborto, síndrome mastite-metrite-agalaxia e anestro (SOBESTIANKY et al., 1999; GIROTTI et al., 2000).

Estudos internacionais apontam a ITU como sendo a principal causa de descarte e morte de reprodutoras, com prevalência de 7,5% no Canadá, 13% na Dinamarca e 40% na França e Inglaterra (PERFUMO et al.¹, 2003 apud MEISTER, 2006). No Brasil, dados de levantamentos epidemiológicos revelam uma prevalência próxima a 30% de ITU em granjas comerciais de suínos (SOBESTIANSKY et al., 1999; ALBERTON et al., 2000).

O *Actinobaculum suis* é um dos principais agentes envolvidos nos casos de infecção urinária em suínos. Este agente, uma vez introduzido no trato urogenital das fêmeas, pode torná-las portadoras e, caso a porca já tenha uma infecção urinária instalada, pode agravar a infecção ou até mesmo causar a morte do animal (DEE, 1991).

A importância e a prevalência de *Actinobaculum suis* nas criações de suínos são frequentemente subestimadas devido à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos atualmente empregados para a sua detecção. Isto se deve ao fato desta bactéria apresentar características que dificultam o seu isolamento, como a necessidade de meios de cultura seletivos, de um longo tempo de incubação (72 horas) e de condições de anaerobiose.

Levando em conta estes aspectos, o presente estudo teve como objetivos desenvolver a reação em cadeia pela polimerase (PCR) como uma ferramenta de diagnóstico para a infecção, determinar a susceptibilidade antimicrobiana deste agente, possibilitando maior agilidade no estabelecimento de medidas controle, e caracterizar genotipicamente os isolados através da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) para uma análise epidemiológica das amostras.

¹ PERFUMO et al. Pathological findings associated with sows death in two in-door intensively managed farms. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 84, n. 2, p. 84-88, 2003.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os principais tópicos a respeito do agente *Actinobaculum suis* estão descritos a seguir.

2.1 Nomenclatura e taxonomia

O agente hoje conhecido como *Actinobaculum suis*, foi inicialmente descrito em 1957, quando Soltys e Spratling o classificaram como pertencente ao gênero *Corynebacterium* devido à sua morfologia difteróide. Posteriormente, estudos taxonômicos mais detalhados fizeram com que este agente fosse transferido para o gênero *Eubacterium* (WEGIENECK; REDDY, 1982a) e em seguida para o gênero *Actinomyces* (LUDWIG et al., 1992). Recentemente, sua taxonomia foi mais uma vez modificada por Lawson et al. (1997) que baseados no sequenciamento de porções 16S do rRNA propuseram um novo gênero dentro da família *Actinomycetaceae*, *Actinobaculum*, que hoje inclui quatro espécies: *Actinobaculum suis*, *Actinobaculum schaalii* (LAWSON et al., 1997), *Actinobaculum massiliae* (GREUB; RAOULT, 2002) e *Actinobaculum urinale* (HALL et al., 2003).

As espécies pertencentes ao gênero *Actinobaculum* possuem formato de bacilo, são gram positivas e anaeróbias estritas ou facultativas. Além disso, o DNA destas bactérias apresenta cerca de 55 a 57 mol% de bases G+C. Os gêneros mais próximos filogeneticamente são o *Arcanobacterium* e o *Actinomyces* (LAWSON et al., 1997; SCHAAL; YASSIN; STACKEBRANDT, 2006). Um esquema simplificado da filogenia do gênero *Actinobaculum* é apresentado na figura 1.

Figura 1 - Árvore filogenética mostrando a relação do gênero *Actinobaculum* sp com outros gêneros

Fonte: Lawson et al. (1997).

Nota: A árvore é baseada na comparação de aproximadamente 1320 nucleotídeos e os valores descritos estão expressos em porcentagens e representam a similaridade entre os agentes.

2.2 Morfologia, metabolismo e perfil bioquímico

O *Actinobaculum suis* é um agente Gram positivo em formato de bastonete, não formador de esporos e imóvel. Trata-se de uma bactéria de metabolismo anaeróbico, fermentativo, urease positiva, não produtora de catalase e indol, não redutora de nitrato e que tem seu crescimento ótimo em pH 7 a 8 e 37°C. (WEGIENECK; REDDY, 1982a). As principais características bioquímicas do *A.suis* encontram-se relacionadas no quadro 1.

Dentre vários substratos testados, o *A. suis* fermenta somente a maltose, o amido e o glicogênio e produz acetato, formiato e etanol, mas não produz propionato como principal produto final do metabolismo de carboidratos. Os principais componentes da parede celular deste microorganismo são a ramnose e a lisina, estando presentes em menor quantidade manose, ácido glutâmico e alanina (WEGIENECK; REDDY, 1982a).

Segundo Wegieneck e Reddy (1982b) o meio composto por trypticase, extrato de levedura, amido, minerais, cisteína e carbonato de sódio se mostrou um excelente meio de crescimento para o *A.suis*. Esse crescimento se mostrou consideravelmente menor quando o amido foi substituído pela maltose.

Quadro 1 - Principais características bioquímicas do *A.suis*

Característica	Cepa <i>A.suis</i> Soltys 50052
Hidrólise de ureia	Positivo
Fermentação de glicose	Negativo
Fermentação de maltose	Positivo
Fermentação de sacarose	Negativo
Produção de indol	Negativo
Nitrato redutase	Negativo

Fonte: Wegieneck e Reddy (1982a).

2.3 Epidemiologia

A presença de *Actinobaculum suis* foi relatada em diversos países incluindo Alemanha (BERNER; BOLTZ; MARX, 1968), Argentina (SOBESTIANSKY et al., 1993), Austrália (GLAZERBROOK; DONALDSON-WOOD; LADDS, 1973), Canadá (PERCY; RUHNKE; SOLTYS, 1966), Dinamarca (LARSEN, 1970), Estados Unidos (WALKER; MACLACHLAN, 1989), Finlândia (KAUKO; SCHILDT; SANDHOLM, 1977), França (MADEC; DAVID, 1983), Holanda (FRIJHLINK; VAN DIJK; GOUDSWAARD, 1969), Hong Kong (MUNRO; WONG, 1972), Hungria (BIKSI et al., 1997), Malásia (BAHAMAN; LEE; TOO, 1984), Noruega (AALVIK, 1968), Portugal (PERESTRELO et al., 1993), Reino Unido (SOLTYS; SPRATLING, 1957),

Rússia (PLESCHAKOWA et al., 2004) e Suíça (SCHALLIBAUM; HANI; NICOLET, 1976).

No Brasil, a presença deste agente foi descrita por Oliveira, Barcellos e Borowky (1983) que isolaram a bactéria a partir de suabes coletados de divertículos prepuciais.

O *A. suis* é tem sido isolado a partir de amostras de urina, bexiga, suabes de divertículos prepuciais e sêmen (SOLTYS; SPRATLING, 1957; LARSEN, 1970; HOGH; BOLM; LARSEN, 1984; SOBESTIANSKY et al., 1991). O agente também pode ser encontrado no ambiente, principalmente nas baias e camas de machos portadores (SOBESTIANSKY et al., 1991; WENDT; SOBESTIANSKY; BOLLWAHN, 1993).

2.4 Patogenia

O prepúcio e o divertículo prepucial dos suínos são os principais habitat do *A. suis*, uma vez que nestes locais existem condições propícias para o seu desenvolvimento, como anaerobiose e temperatura ideal (SOBESTIANSKY et al., 1991). A maioria dos machos da espécie suína, com idade de seis meses ou mais, albergam o *A. suis* no divertículo prepucial, sendo que a colonização deste órgão pode acontecer quando os leitões estão apenas com poucas semanas de idade (TAYLOR, 2006). A infecção do macho geralmente ocorre através do contato com pisos de baias contaminados ou fômites. No macho, a presença do *A. suis* não está ligada à ocorrência de doença e seu isolamento, inclusive do sêmen de animais normais, é frequente (SOBESTIANSKY et al., 1991).

A infecção da fêmea pelo *A. suis* ocorre pelo contato com o ambiente contaminado ou por ocasião da cobertura por cachaços portadores. Pesquisas demonstram que a simples presença do *A. suis* não significa infecção urinária, pois algumas fêmeas podem ser apenas portadoras deste agente, sem apresentar sintomatologia clínica. Porém, uma vez introduzido no trato urogenital, o *A. suis* pode, por via ascendente, atingir a bexiga e os rins, causando cistites e pielonefrites (DEE, 1991; WENDT; SOBESTIANSKY; BOLLWAHN, 1993; SOBESTIANSKY et al., 1999; ALBERTON et al., 2000).

As infecções urinárias provocadas pelo *A. suis* raramente são puras, sendo na maioria dos casos associadas a uma flora mista. Isto estaria relacionado ao fato de o *A. suis* possuir melhores condições de aderência em tecidos previamente lesionados por outras bactérias, uma vez que nestes, receptores específicos para sua ligação estariam expostos (ALBERTON; WERNER, 1998).

Larsen, Hogh e Hovind-Hougen (1986) realizaram estudos a respeito das propriedades de adesão do *A. suis* e constataram que algumas cepas possuem fímbrias capazes de se aderir às células epiteliais da bexiga suína por meio de glicoconjugados que atuam como sítios específicos para ligação do agente.

2.5 Sinais clínicos

As infecções urinárias por *A. suis* são classificadas como agudas ou crônicas.

As infecções agudas podem cursar sem sintomas clínicos. Porém, os animais afetados geralmente apresentam hematúria, descarga vulvar, polipnéia, cianose, andar cambaleante e tremores. Algumas porcas podem morrer de forma súbita, aparentemente devido à insuficiência renal aguda (SOBESTIANSKY et al., 1991; TAYLOR, 2006).

A forma crônica geralmente é observada em porcas velhas, que podem apresentar inapetência, emagrecimento progressivo, polidipsia, disúria, hematúria, piúria, anemia e uremia (SOBESTIANSKY et al., 1999; ALBERTON et al., 2000).

Quanto ao exame físico-químico da urina, a coloração avermelhada e às vezes turva é a principal característica encontrada em infecções urinárias com participação do *A. suis* (Figuras 2 e 3). Outros achados compatíveis com a presença deste agente são proteinúria, pH acima de 8 e ausência de nitriúria (SOBESTIANSKY et al., 1995; ALBERTON et al., 2000; GOLDBERG, 2007).

Figura 2 - Escala para classificação das urinas quanto à cor: incolor, amarelo clara, amarelo escura e avermelhada

Fonte: Amigo (2012).

Figura 3 - Escala para classificação das urinas quanto ao aspecto: límpida e turva

Fonte: Amigo (2012).

2.6 Lesões

As infecções por *A.suis* podem desencadear lesões ao longo de todo o trato urinário, porém se restringem a este sistema, não havendo registros de lesões provocadas por este agente em outros locais do organismo (TAYLOR, 2006).

As mucosas da bexiga, uretra, ureteres e pelve renal podem estar fibrinopurulentas, hemorrágicas ou necróticas e com áreas de perda de epitélio (TAYLOR, 2006).

A bexiga geralmente apresenta conteúdo hemorrágico e as paredes espessadas (Figura 4). Ao exame histopatológico, observa-se metaplasia epitelial com transformação de células epiteliais em globosas. A túnica submucosa apresenta

intensa infiltração por linfócitos e plasmócitos (SOBESTIANSKY et al., 1991; LIEBHOLD et al., 1995).

Os ureteres estão geralmente dilatados, espessados e preenchidos com urina purulenta avermelhada e coágulos (WOLDEMESKEL; DROMMER; WENDT, 2002; SOBESTIANSKY et al., 1991) (Figura 5).

A infecção pode ainda afetar a musculatura lisa dos ureteres, o que prejudicaria o peristaltismo e favoreceria o refluxo de urina para a pelve renal acarretando no desenvolvimento de pielonefrites (WOLDEMESKEL; DROMMER; WENDT, 2002).

Os rins afetados frequentemente estão aumentados e apresentam áreas irregulares amareladas devido à degeneração do parênquima (Figura 5). A pelve renal pode estar dilatada e contendo fluido mucoso. A porção medular apresenta focos de necrose (WOLDEMESKEL; DROMMER; WENDT, 2002; TAYLOR, 2006).

Figura 4 - Lesões macroscópicas em bexiga de fêmea suína compatíveis com infecção por *Actinobaculum suis*: parede espessada e mucosa com superfície hemorrágica e purulenta

Fonte: Meredith ([2010]).

Figura 5 - Lesões em trato urinário compatíveis com infecção por *Actinobaculum suis*: rins dilatados e paredes da bexiga e ureteres espessados

Fonte: Meredith ([2010]).

2.7 Diagnóstico

Os principais métodos utilizados para a detecção de *Actinobaculum suis* e outras bactérias do gênero *Actinobaculum* sp. encontram-se descritos nos tópicos a seguir.

2.7.1 Isolamento em placa

A típica morfologia das colônias de *Actinobaculum suis* facilita no seu reconhecimento. As colônias em placa de ágar sangue apresentam-se brancas, circulares e com margens irregulares. Muitas vezes, também apresentam o centro elevado, o que lhes dá um aspecto de “ovo frito” (LAWSON et al., 1997). Após 48 horas de incubação as colônias já são evidentes, porém elas ficam maiores e exibem morfologia típica somente depois de 72 a 96 horas de incubação (Figura 6) (WALKER; GREENE; GERIG, 1990).

O uso de meio seletivo composto de ágar sangue adicionado de colistina (10mg/L), ácido nalidíxico (15mg/L) e metronidazol (50mg/L) torna o isolamento mais efetivo, mas ainda assim a detecção de *A. suis* através deste método é considerada difícil (DAGNALL; JONES, 1982; WENDT; SOBESTIANSKY; AMTSBERG, 1993).

Figura 6 - Colônias de *Actinobaculum suis* em ágar sangue após 72 horas de incubação em anaerobiose

Fonte: Amigo (2012).

2.7.2 Detecção através de imunofluorescência indireta

A imunofluorescência indireta (IFI) é também utilizada para a detecção de *A. suis* por ser um método rápido, seguro, econômico e que apresenta segurança e confiabilidade mesmo quando o microorganismo está presente em pequenas quantidades. Entretanto, ainda são poucos os dados para comparação entre técnicas de diagnóstico para este agente (LANGFELDT; WENDT; AMTSBERG, 1990; WENDT; SOBESTIANSKY; AMTSBERG, 1993; MENIN et al., 2008).

A pesquisa de *Actinobaculum suis* através de IFI geralmente é realizada segundo metodologia descrita por Langfeldt, Wendt e Amtsberg (1990); Wendt e Vesper (1992) e Wendt, Sobestiansky e Amtsberg (1993). A IFI utiliza um conjugado de fluoresceína e o anti-soro (anti-*Actinobaculum suis*), sendo estes geralmente cedidos pela Escola Superior de Veterinária de Hannover/ Alemanha (SOBESTIANSKY et al., 1995; ALBERTON et al., 2000; PORTO et al., 2003) (Figura 7).

Figura 7 - *Actinobaculum suis* com fluorescência evidente e brilhante observada em esfregaço feito a partir de material colhido do divertículo prepucial

Fonte: Sobestiansky et al. (1995).

2.7.3 Detecção através da reação em cadeia pela polimerase

Apesar da Reação em cadeia pela polimerase (PCR) ainda não ter sido utilizada como método de diagnóstico para a presença de *A. suis* em suínos, este mecanismo já vem sendo aplicado para detecção de outras espécies pertencentes ao gênero *Actinobaculum* sp. Estas espécies são desprovidas de interesse veterinário, uma vez que parecem afetar apenas humanos.

Bank et al. (2010) utilizaram esta técnica para detecção de *Actinobaculum schaalii* a partir de urina humana e constataram a PCR como um método rápido e confiável para detecção, o que contribuiria para um melhor tratamento e, assim a uma recuperação mais rápida dos pacientes.

No que se refere ao *Actinobaculum suis*, porções altamente conservadas da porção 16S rRNA deste agente já foram sequenciadas (LUDWIG et al., 1992), o que possibilita o desenvolvimento da PCR como ferramenta para detecção deste agente.

2.8 Controle e tratamento

O controle e a prevenção das infecções de trato urinário dependem diretamente da correção de fatores de risco, tais como: qualidade da água fornecida aos animais, higiene das instalações, composição da ração, doenças locomotoras, manejo da granja, entre outros (SOBESTIANSKY et al., 1995; ALBERTON; WERNER, 1998).

O uso de acidificantes de urina como o cloreto de amônio e o ácido cítrico em determinadas fases do ciclo reprodutivo da fêmea também é uma alternativa para o controle das infecções urinárias (SOBESTIANSKY et al., 1999). Dee, Tracy e King (1994) constataram redução da contagem bacteriana com o uso de ácido cítrico por 14 dias em cistites causadas por *Actinobaculum suis*.

O tratamento das infecções está relacionado à prevalência da doença no plantel. Nas granjas com baixa prevalência recomenda-se o tratamento individual

dos animais, enquanto que nos casos de alta prevalência o indicado é o tratamento coletivo via ração (ALBERTON; WERNER, 1998).

As drogas mais utilizadas nas últimas décadas para o tratamento de ITU via ração foram: enrofloxacin, flumequina, tetraciclina (clortetraciclina e oxitetraciclina) e norfloxacin (KOLLER et al., 2006).

O *Actinobaculum suis* mostra-se sensível a vários princípios antimicrobianos, destacando-se os grupos dos beta-lactâmicos, dos macrolídeos, das tetraciclina, dos nitrofuranos, além das pleuromutilina e do florfenicol. A sensibilidade é variável ao grupo das quinolonas, sendo que apenas a marbofloxacin apresentou-se efetiva nos estudos publicados (WEGIENEK; REDDY, 1982; BIKSI et al., 2003).

Por outro lado, geralmente o *A.suis* é resistente à colistina, ao metronidazol, ao ácido nalidíxico e aos aminoglicosídeos, com exceção da espectinomicina (DAGNALL; JONES, 1982; BIKSI et al., 2003).

2.9 Caracterização genotípica

A caracterização genotípica oferece uma grande variedade de metodologias com especificidade, reprodutibilidade e poder discriminatório variáveis, muitas das quais tem sido descritas para diferenciar amostras da família *Actinomycetaceae* com sucesso (HUNT; ADLER; TOWNSEND, 2000).

O polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) tem como objetivo determinar distâncias e similaridades entre materiais genéticos de origens diferentes, fornecendo informações a respeito da evolução filogenética e variabilidade genética dentro de um mesmo grupo. O AFLP com uma única enzima é baseado em quatro etapas (MCLAUCHLIN et al., 2000):

- 1) Digestão do DNA por uma enzima de restrição;
- 2) Ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem;
- 3) Amplificação seletiva dos fragmentos com *primers* complementares às sequências dos adaptadores;
- 4) Separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose.

Entre as vantagens desta técnica estão rapidez, simplicidade, baixo custo e elevado poder de detecção de variabilidade genética. Por outro lado, a principal desvantagem da técnica de AFLP reside na necessidade de a amostra a ser testada ter sido previamente isolada. Isto porque o DNA a ser utilizado na técnica deve ser extraído a partir de colônias puras do agente, uma vez que o DNA de outras espécies interfere no resultado final (SAVELKOUL et al., 1999; FERREIRA, 2001).

Até o presente não foram identificados relatos do uso do AFLP em isolados de *A. suis*.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

- ✓ Desenvolver a PCR para a detecção de *A.suis* diretamente de urina e suabes prepuciais.
- ✓ Avaliar o limiar de detecção e especificidade da PCR para o *A.suis*.
- ✓ Isolar cepas de *A.suis* a partir de amostras de urina de fêmeas e suabes prepuciais de machos provenientes de diferentes sistemas de produção.
- ✓ Comparar os resultados obtidos através da PCR com o isolamento bacteriano tradicional.
- ✓ Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana das cepas isoladas através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos.
- ✓ Caracterizar genotipicamente as cepas de *A.suis* através do AFLP com uma única enzima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados estão descritos a seguir.

4.1 Amostras

Foram analisados 45 suabes de prepúcio de cachacos e 192 urinas de fêmeas nas fases de gestação e maternidade provenientes de quatro sistemas intensivos de produção de suínos do Estado de São Paulo.

Foram utilizadas como controle positivo da reação em cadeia pela polimerase, avaliação dos meios de cultura e padronização da determinação da concentração inibitória mínima, três cepas de *A. suis* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Sanidade Suína (VPS-FMVZ-USP) isoladas a partir da urina de uma fêmea com infecção urinária (LSS RG9-3.1/ RG9-3.2/ RG9-3.3).

4.2 Coleta das amostras

Os suabes de prepúcio foram coletados de machos em idade reprodutiva antes da coleta de sêmen e acondicionados em meio de transporte Stuart. As urinas das fêmeas foram coletadas nas primeiras horas da manhã em frascos estéreis, sendo desprezados os primeiros jatos.

As amostras foram transportadas sob-refrigeração (4 °C) até o Laboratório de Sanidade Suína e Virologia da FMVZ/USP.

4.3 Exame bacteriológico

Para a realização do exame bacteriológico das urinas, 10mL de cada uma das amostras foram centrifugados a 4000 X g por 10 minutos. O sedimento resultante das urinas e os suabes provenientes dos machos foram semeados em placas de ágar MacConkey, Chromagar Orientation® e ágar Brucella (Difco-BBL, Detroit, MI /USA) com sangue de carneiro (5%) suplementado com colistina (10mg/L), ácido nalidíxico (15mg/L) e metronidazol (50mg/L). As placas de MacConkey e Chromagar Orientation® foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas para pesquisa de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp e a placa de ágar Brucella suplementada com antimicrobianos foi incubada em anaerobiose por 72 horas para pesquisa de *A. suis*.

Os isolados com características morfológicas sugestivas de *Actinobaculum suis* foram submetidos às provas bioquímicas para identificação. Os confirmados como *A. suis* foram estocados em freezer -86 °C até o momento da extração de DNA.

As amostras caracterizadas como *Escherichia coli* foram armazenadas em ágar nutriente semi-sólido e os isolados caracterizados como *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp foram estocados em freezer -86°C para realização de futuros estudos.

4.4 Susceptibilidade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *A.suis* foi realizada com o auxílio das placas modelo CMV3AGPF -Sensititre Gram Positive Narms Plate Format (Trek Diagnostics Systems- Cleveland, Ohio/ EUA) Os princípios ativos testados e suas respectivas concentrações estão descritos na tabela 1.

Para a adição das culturas bacterianas às placas, as colônias de *A.suis* foram ressuspendidas em caldo Schaedler® (Difco-BBL, Detroit, MI /USA). A

concentração das culturas foi ajustada a 0,2 com auxílio do espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher- Wilmington, EUA) a 600 nm e depois diluídas na proporção de 1:1000 em caldo Schaedler® (Difco-BBL, Detroit, MI /USA).

Para a interpretação dos resultados, foram adotados os critérios discriminados na tabela 1.

Tabela 1 - Critérios utilizados para interpretação dos perfis de susceptibilidade antimicrobiana

Antimicrobianos	Sigla	Variação	Sensível	Intermediário	Resistente	Referência
Ceftiofur	CTF	1 - 16	≤2	4	≥8	M31 ¹
Ciprofloxacina	CIP	0,12 - 4	≤1	2	≥4	M100 ²
Cloranfenicol	CHL	2 - 32	≤4	-	≥8	M31 ¹
Daptomicina	DAP	0,25 - 16	≤ 4			M100 ²
Eritromicina	ERY	0,25 - 8	≤0,5	1 a 2	≥4	M100 ²
Lincomicina	LIN	1 - 8	≤2	4	≥8	M100 ²
Linezolida	LZD	0,5 - 8	≤2	4	≥8	M100 ²
Nitrofurantoína	NIT	2 - 64	≤32	64	≥128	M100 ²
Penicilina	PEN	0,25 - 16	≤0,5	1	≥2	M11 ³
Quinupristina	SYN	0,5 - 32	≤1	2	≥4	M100 ²
Tetraciclina	TET	1 - 32	≤4	8	≥16	M11 ³
Tigeciclina	TGC	0,06 - 0,5	≤0,25	0,5	>0,5	EUCAST ⁴
Tilosina	TYLT	0,25 - 32	≤1	2 a 4	>4	Hampson et al ⁵
Vancomicina	VAN	0,25 - 32	≤ 4	8 a 16	≥32	M100 ²

Nota: ¹ CLSI – M31-A3 (2008), ² CLSI – M100-S15 (2005), ³ CLSI – M11-A7 (2007),
⁴ EUCAST (2012), ⁵ Hampson, Stephens e Oxberry (2006)

4.5 Reação em cadeia pela polimerase

4.5.1 Extração do DNA bacteriano

As amostras de urina, os suabes de machos e os isolados identificados como *A. suis* foram submetidos à extração do DNA genômico segundo protocolo descrito por Boom, Sol e Salimans (1990), com algumas modificações.

No caso das amostras de urina, 10 mL de cada amostra foi centrifugado a 4, 000 X g por 10 minutos e 200 µl do pélete obtido foi submetido ao processo de extração. As culturas puras foram obtidas a partir do raspado do crescimento em ágar após 72 horas de incubação.

As amostras (suabe, pélete ou cultura) foram submetidas a uma pré-lise com 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 100 µL de lisozima (100 mg/mL) durante 60 minutos a 37 °C. Após este período de pré-lise foram adicionados 1000 µl de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H₂O MilliQ ®), 40 µL de solução carreadora (1 g de Diatomaceous Earth, 50 µL HCl 37% e 5 mL H₂O MilliQ ®) e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, estas foram centrifugadas 12000 x g por um minuto e 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o pelete resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeiras com 500 µL de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H₂O MilliQ ®), as duas seguintes com 500 µL de etanol 70% (- 20 °C) e a última com 500 µL de acetona.

Após as lavagens o microtubo contendo o pélete foi mantido em estufa a 37 °C por cerca de 60 minutos. O pélete foi ressuspensionado pela adição de 150 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H₂O MilliQ ®), centrifugado a 12000 x g por cinco minutos, removido o sobrenadante (DNA eluído da sílica) e, este, foi armazenado a -20 °C até sua amplificação.

4.5.2 Desenho dos *primers* Acs1 e Acs2

Para a criação dos *primers* foram utilizadas as sequências do RNA ribossomal 16S descritas por Ludwig et al. (1992) depositadas no *GenBank* (Número de acesso S83623.1). Após a escolha dos iniciadores a PCR foi padronizada com as concentrações de reagentes e o programa de amplificação como descrito a seguir. O quadro 2 apresenta as sequencias dos *primers* usados para a identificação de *Actinobaculum suis*:

Quadro 2 - Sequências dos *primers* utilizados na PCR para detecção de *A. suis*

Primer	Sequência	Tamanho do Produto Amplificado (pb)
Acs1	CGTGGGTAACCTGCCCTCAACTG	132
Acs2	CAAACCTGATAGGCCGCGAGCCC	

4.5.3 Amplificação do DNA

Para a padronização da PCR, diluições seriadas da cultura de *A. suis* LSS RG9-3.1 foram submetidas à extração do DNA bacteriano e à reações com diferentes temperaturas de anelamento (50 °C a 60 °C) e concentrações de Cloreto de Magnésio (1,5 a 3 mM).

Após observação destes resultados, a PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 5,0 µL de PCR Buffer, 200mM dNTP, 20 pmoles dos *primers* Acs1 e Acs 2, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Inc, Maryland/USA) e água ultrapura até o volume final de 50 µL. O programa utilizado após a padronização consistiu de um ciclo a 94 °C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C e finalizando com 5 minutos a 72 °C.

4.5.4 Avaliação do limite de detecção da PCR (sensibilidade analítica)

O limite de detecção da PCR foi determinado através de diluições seriadas da cultura de *A. suis* LSS RG9-3.1. Foram feitas 10 diluições (10⁻¹ a 10⁻¹⁰) e para cada uma realizou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e a extração do DNA bacteriano para a PCR.

4.5.5 Avaliação da especificidade da PCR

Para verificação da especificidade da PCR foram submetidas à reação padronizada para o *A. suis*, amostras de 23 diferentes agentes bacterianos e virais que podem infectar ou fazer parte da microbiota dos suínos (Quadro 3).

Além disso, o produto da reação em cadeia pela polimerase de amostras previamente caracterizadas como *A.suis* foi sequenciado e comparado às sequências depositadas no GenBank.

Quadro 3 - Espécies bacterianas utilizadas para testar a especificidade analítica da PCR para *A.suis*

Espécies	Amostra/Identificação
<i>Actinobaculum suis</i>	LSS RG9-3.1/ RG9-3.2/ RG9-3.3
<i>Actinobaculum suis</i>	Isolados deste estudo (20)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ATCC 27089
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	ATCC 19411
<i>Arcobacter butzleri</i>	ATCC 49616
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	ATCC 43158
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC 4617
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	ATCC 27164
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	ATCC 51139
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 43478
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33292
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12922
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	ATCC 19414
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11105
<i>Haemophilus parasuis</i>	Isolado de campo
<i>Lawsonia intracellularis</i>	Amostra de DNA positiva
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	ATCC 25095
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	ATCC 17981
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC 43137
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Isolado de campo
<i>Streptococcus suis</i>	Isolado de campo

4.5.6 Detecção do produto de amplificação (amplicon)

A detecção dos produtos de amplificação (10 µl produto e 1µl de corante SYBR® Safe- (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA/USA) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TBE (0,04 M tris-borato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

O gel foi fotografado através de luz ultravioleta em um sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amersham Biosciences). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de marcadores de peso molecular conhecidos como o 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.6 Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, foram escolhidos três isolados de *A.suis* (a cepa RG 9-3.1 e duas cepas provenientes de suabes prepuciais).

Primeiramente foi realizada a etapa de purificação, onde o DNA das amostras a serem sequenciadas foi removido do gel de agarose. Esta etapa foi feita com auxílio do kit comercial AxyPrep™ Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA/USA).

Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento propriamente dita utilizando para um volume final de 20µL, 2µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4µL de tampão Save Money 5X, 10pmoles de cada primer senso e antisenso (Acs-1 e Acs-2) e 13,6µL de DNA purificado. As condições da reação de sequenciamento no termociclador automático modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research™) foram: 96 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

A seguir, os produtos da reação foram submetidos à etapa de precipitação. Para cada 10 µL do produto das reações de sequenciamento, foram adicionados 2,5 µL de EDTA (125mM) e 30 µL de etanol absoluto. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos ao

abrigo da luz. Na sequência, foram centrifugadas a 16.000 g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento remanescente foi lavado com 65 µL de etanol a 70% e centrifugado a 16.000g durante 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado por inversão. O pellet foi seco em termobloco a 95 °C por 10 minutos para evaporar o etanol residual e mantido a temperatura de – 20 °C até o momento da utilização.

Antes de serem aplicadas na placa de sequenciamento, as amostras foram homogeneizadas com formamida, colocadas em banho seco por 3 minutos a 95 °C e depois refrigeradas a 4 °C por 2 a 4 minutos. Em seguida, a placa foi levada ao sequenciador automático ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) e as sequências obtidas foram submetidas à BLASTn² para confirmação.

4.7 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por Mclauchlin et al. (2000) utilizando-se a endonuclease de restrição *Hind* III como única enzima.

Para clivagem do DNA bacteriano, 5 µl de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III (Invitrogen, São Paulo), tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 µl. O tubo foi incubado a 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5 µl do DNA clivado foi adicionada a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 µl. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80 °C por 10 minutos.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µl do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do primer (HI-G), 1,0 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação a 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60° C e 2,5 minutos a 72°C.

A detecção dos produtos de amplificação (15 µl produto) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 2% a 35 volts por 26 horas. O gel foi

² BLAST Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2011.

corado com SYBR® Safe (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA/USA) por 40 min e fotografado através de luz ultravioleta em um sistema de fotodocumentação Gel DocXR (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de pares de base 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.8 Análises estatísticas

A concordância entre o isolamento e a PCR foi estimada usando o teste Kappa (SMITH, 1995).

Para análise estatística dos fragmentos obtidos através do AFLP foi utilizado o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem/ Belgium). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada por este coeficiente foi possível determinar os grupos pelo método de UPGMA (“Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average”), que está representado pela forma de dendrograma. As amostras que apresentaram menos de 90% de similaridade foram classificadas em diferentes perfis.

5 RESULTADOS

Os resultados encontrados estão descritos a seguir.

5.1 Reação em cadeia pela polimerase

A PCR apresentou um limite de detecção entre 1×10^1 UFC/mL e 1×10^2 UFC/mL para um resultado positivo (Figura 8). Além disso, nenhuma das outras 23 cepas bacterianas submetidas à reação padronizada para o *A.suis* foi positiva na PCR. Os resultados obtidos com o sequenciamento mostraram que os fragmentos amplificados apresentam grande similaridade quando comparados a outras sequências de *Actinobaculum* sp depositadas no GenBank (Tabela 2). A amostra de urina apresentou similaridade de 99% e as provenientes de suabs prepuciais apresentaram 99% e 100% respectivamente com relação à sequência NR 044760.1 do GenBank.

Figura 8 - Limite de detecção da PCR para *Actinobaculum suis*

Nota: Canaleta 1: $3,3 \times 10^7$ UFC/mL; Canaleta 2: $3,3 \times 10^6$ UFC/mL; Canaleta 3: $3,3 \times 10^5$ UFC/mL; Canaleta 4: $3,3 \times 10^4$ UFC/mL; Canaleta 5: $3,3 \times 10^3$ UFC/mL; Canaleta 6: $3,3 \times 10^2$ UFC/mL; Canaleta 7: $3,3 \times 10^1$ UFC/mL; Canaleta 8: $3,3 \times 10^0$ UFC/mL; Canaleta 9: Amostra negativa; Canaleta 10: Controle Positivo; Canaleta 11: Controle Negativo; Canaleta 12: Marcador 100bp.

Tabela 2 - Verificação de sequencias similares às obtidas através do BlastN

Acesso BlastN	Descrição	Máxima identidade		
		Suabe prepucio C1-15	Suabe prepucio C2-2	Urina Fêmea RG9-3
NR 044760.1	<i>Actinobaculum suis</i> 16S, complete sequence >qb/S83	99%	100%	99%
JF220866.1	Uncultured bacterium clone ncd2655a06c1 16S ribossomal RNA gene	92%	93%	92%
FJ390135.1	<i>Actinobaculum massiliense</i> isolate 307 16S ribossomal RNA gene, part	92%	93%	92%
FJ390134.1	<i>Actinobaculum massiliense</i> isolate 301 16S ribossomal RNA gene, part	92%	93%	92%
FJ390133.1	<i>Actinobaculum massiliense</i> isolate 288 16S ribossomal RNA gene, part	92%	93%	92%

Fonte: Blast Aplicativo disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 2011.

5.2 Comparação entre métodos de detecção de *A.suis*

Dentre as 237 amostras processadas, a PCR detectou 22,8% (54/237) de positivos para o *A.suis* enquanto que o isolamento apontou a presença de somente 5,9% (14/237). Nas amostras de urina, a PCR detectou o *A.suis* em 8,9% (17/192) dos casos e o isolamento não identificou nenhum positivo. Nos suabes prepuciais a prevalência de *A.suis* foi de 82,2% (37/45) através da PCR e de 31,1% (14/45) através do isolamento (Tabela 3).

A análise de concordância entre as técnicas de PCR e isolamento forneceu um valor de Kappa de 0,358, demonstrando uma fraca concordância entre os métodos testados.

Tabela 3 - Resultados da PCR e do isolamento para detecção de *A. suis* em suabes prepuciais de suínos e amostras de urina

Amostra		Isolamento	
		Positivo	Negativo
Urina	Positivo	0,0%	8,9% (17/192)
	Negativo	0,0%	91,1% (175/192)
Swab prepucial	Positivo	31,1% (14/45)	51,1% (23/45)
	Negativo	0,0%	17,8% (8/45)

5.3 Ocorrência de *A.suis* e outros agentes bacterianos

Considerando as 192 amostras de urina analisadas, 8,9% (17/192) foram positivas para *A.suis*, sendo que destas 5,7% (11/192) consistiam em infecções puras e aproximadamente 3,1% (6/192) tinham outros agentes simultaneamente (Tabela 4).

No que se refere aos outros agentes pesquisados, a *E.coli* foi o agente mais frequente, seguido do *Streptococcus* sp e do *Staphylococcus* sp (Tabela 4).

Tabela 4 - Ocorrência de *A.suis* e/ou outros agentes bacterianos nas 192 amostras de urina

Microorganismo	Amostras positivas
<i>Actinobaculum suis</i>	11 (5,7%)
<i>Escherichia coli</i>	23 (12%)
<i>Streptococcus</i> sp	9 (4,7%)
<i>Staphylococcus</i> sp	8 (4,2%)
<i>A. suis</i> + <i>E.coli</i>	2 (1,0%)
<i>A. suis</i> + <i>Streptococcus</i> sp	2 (1,0%)
<i>A. suis</i> + <i>Staphylococcus</i> sp	0,0
<i>A. suis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i> sp	1 (0,5%)
<i>A. suis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> sp	0,0
<i>A. suis</i> + <i>Streptococcus</i> sp + <i>Staphylococcus</i> sp	0,0
<i>A. suis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i> sp + <i>Staphylococcus</i> sp	1 (0,5%)
<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i> sp	26 (13,5%)
<i>E. coli</i> + <i>Staphylococcus</i> sp	8 (4,2%)
<i>Streptococcus</i> sp + <i>Staphylococcus</i> sp	5 (2,6%)
<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus</i> sp + <i>Staphylococcus</i> sp	16 (8,3%)
Amostras negativas	80 (41,7%)
Total	192 (100%)

5.4 Susceptibilidade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos para as 20 cepas provenientes de machos e três isoladas de fêmeas encontram-se nas tabelas 5 e 6.

A maioria das cepas de machos foi resistente aos macrolídeos (eritromicina e tilosina), à lincomicina, à ciprofloxacina, à tetraciclina e à daptomicina. Estes mesmos isolados foram sensíveis à penicilina, ceftiofur, tigeciclina, nitrofurantoína, cloranfenicol, vancomicina e linezolida.

As cepas de fêmeas foram resistentes aos macrolídeos, à lincomicina, à ciprofloxacina, à daptomicina e ao cloranfenicol. Porém, foram sensíveis à tetraciclina, penicilina, ceftiofur, tigeciclina, nitrofurantoína, vancomicina e linezolida.

Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 23 isolados de *A.suis* testados

Antimicrobiano	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Ceftiofur	100,0	0,0	0,0
Ciprofloxacina	0,0	4,3	95,7
Cloranfenicol	87,0	0,0	13,0
Daptomicina	0,0	0,0	100,0
Eritromicina	0,0	0,0	100,0
Lincomicina	0,0	0,0	100,0
Linezolida	100,0	0,0	0,0
Nitrofurantoína	100,0	0,0	0,0
Penicilina	60,9	39,1	0,0
Quinupristin-dalfopristin	100,0	0,0	0,0
Tetraciclina	13,0	30,4	56,5
Tigeciclina	69,6	30,4	0,0
Tilosina	0,0	0,0	100,0
Vancomicina	100,0	0,0	0,0

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos testados frente as 23 cepas de *A.suis* e valores de CIM 50 e CIM 90

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)											CIM 50	CIM 90
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06		
Ceftiofur	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	≤1	≤1
Ciprofloxacina	0	0	0	15	7	1	0	0	0	0	0	8	8
Cloranfenicol	0	0	0	3	5	15	0	0	0	0	0	2	8
Daptomicina	0	20	3	0	0	0	0	0	0	0	0	32	32
Eritromicina	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	>16	>16
Lincomicina	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	>8	>8
Linezolida	0	0	0	0	0	0	6	17	0	0	0	0,5	1
Nitrofurantoína	0	0	1	2	8	12	0	0	0	0	0	2	8
Penicilina	0	0	0	0	0	0	9	8	6	0	0	0,5	1
Quinupristina	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	≤0,5	≤0,5
Tetraciclina	0	2	11	7	0	3	0	0	0	0	0	16	16
Tigeciclina	0	0	0	0	0	0	0	7	5	6	5	0,25	0,5
Tilosina	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>64	>64
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	≤0,25	≤0,25

Nota: Resistente Intermediário Sensível

5.5 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

O número de fragmentos observados no AFLP variou de 5 a 12 com tamanhos de 400 a 1300 pb. O dendograma gerado a partir do Software Bionumerics evidenciou um total 8 diferentes perfis eletroforéticos, sendo que estes foram agrupados em dois clusters principais com 62% de similaridade. Das 23 cepas submetidas ao AFLP, 19 foram reunidas no cluster I e 4 no cluster II.

Como pode ser observado na figura 9, o cluster I agrupou 3 perfis com 77% de similaridade, provenientes de cepas de machos da granja 1, machos da granja 2 e da urina de fêmea utilizada como controle das reações de PCR. O cluster II foi constituído apenas de cepas de machos da granja 2, agrupando 5 perfis com similaridade de 70%.

As cepas isoladas da amostra de urina foram idênticas entre si e apresentaram similaridade de aproximadamente 83% em relação as cepas de suabes prepuciais das granjas 1 e 2. As cepas isoladas a partir dos machos da granja 1 (cor verde), apresentaram menor variabilidade do que as da granja 2 (cor vermelha), com nove das 12 amostras apresentando similaridade superior a 90% e sendo consideradas como um único perfil.

Algumas colônias isoladas de um mesmo animal foram agrupadas em perfis distintos como nos perfis 5 e 6. Por outro lado, amostras oriundas de diferentes animais de uma mesma granja foram reunidas em um mesmo perfil como observado nos perfis 2 e 7. De modo geral o AFLP com uma única enzima foi capaz de separar as cepas de acordo com a granja de origem e o animal.

Figura 9 - Dendrograma ilustrando os resultados obtidos a partir da análise de cepas *Actinobaculum suis* isoladas de fêmeas e machos suínos do Estado de São Paulo, Brasil

6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho estão discutidos a seguir.

6.1 Reação em cadeia pela polimerase

Até o momento, técnicas moleculares não haviam sido utilizadas para a detecção de *Actinobaculum suis* em suínos. Por outro lado, Bank et al. (2010) chegaram a resultados promissores no uso da PCR para detecção de *Actinobaculum shaalii* em amostras de urina humana.

Diferente de Bank et al. (2010) que utilizaram primers desenhados a partir de sequencias DNA *gyrase B* (*gyrB*), neste estudo os primers Acs1 e Acs2 foram desenvolvidos a partir de sequencias 16S rRNA descritas por Ludwig et al. (1992), as quais são consideradas altamente conservadas sendo amplamente usadas na detecção e tipificação.

Os primers Acs1 e Acs2 foram específicos para detecção do *A.suis*, uma vez que não amplificaram DNA dos outros 23 agentes testados, incluindo o do *Arcanobacterium pyogenes*, bactéria mais próxima filogeneticamente ao gênero *Actinobaculum* (LAWSON et al., 1997). Além disso, quando os primers foram testados em amostras clínicas, não foram observadas bandas inespecíficas.

As três amostras submetidas ao sequenciamento, mostraram pelo menos 99% de similaridade com outras amostras de *Actinobaculum suis*, comprovando a especificidade do teste de PCR para a determinação de amostras positivas.

O limite de detecção encontrado para esta PCR, entre 10 e 100 UFC/mL, é compatível com algumas publicações baseadas em diagnóstico através de ferramentas moleculares, sendo inclusive mais sensível do que o relatado por Bank et al. (2010) para o *A. shaalii*, que descreveu um limite entre $1,5 \times 10^3$ UFC/mL e $1,5 \times 10^4$ UFC/mL (BANK et al., 2010). Estes resultados corroboram a tendência das pesquisas atuais na busca de alternativas mais sensíveis do que o isolamento para o diagnóstico das doenças infecciosas.

6.2 Comparação entre Métodos de Detecção de *A.suis*

Considerando a presença de *A.suis* nas amostras de urina analisadas, o método de isolamento não foi capaz de detectar nenhuma amostra positiva, enquanto que a PCR detectou 8,9% (17/193). A frequência encontrada assemelha-se com Reis et al. (1992) e Menin et al. (2008) que isolaram o agente em 2,0% (1/60) e 4,0% (37/922) dos casos examinados no Brasil. Quando a técnica utilizada na detecção foi a IFI, Vaz et al. (1997), Alberton et al. (2000) e Porto et al. (2003) encontraram uma prevalência de 16,8% (17/101), 20,6% (327/1585) e 31,4% (11/35) em amostras provenientes de criações brasileiras.

A IFI também foi usada para detecção de *A.suis* a partir de urina de porcas na Alemanha e nos Estados Unidos, sendo relatadas prevalências de 11,4% (108/943) e de 26% (10/38) (WENDT; VESPER, 1992; DEE; CARLSON; COREY, 1993). Estes resultados sugerem uma maior sensibilidade da IFI em comparação com o isolamento na pesquisa deste agente a partir de urina.

Com relação aos suabes prepuciais, o isolamento apontou 31,1% (14/45) de positivos enquanto que a PCR detectou 82,2% (37/45). Estes valores estão de acordo com outros estudos de prevalência realizados no Brasil que mostram taxas de 53,8% (21/39) através do isolamento e 78% (75/96) através de imunofluorescência indireta em prepúcio de machos suínos (OLIVEIRA et al., 1988; SOBESTIANSKY et al., 1993).

Diversos autores ao redor do mundo também descreveram a ocorrência de *A.suis* em suabes prepuciais de cachaços. Pijoan, Lastra e Leman (1983), com 60,5% (23/38) nos Estados Unidos, Jones e Dagnall (1984), com 89,0% (200/224) no Reino Unido, ambos através de isolamento. Sobestiansky et al. (1993) descreveu 67,0% (52/78) de positivos em Portugal e 76,0% (16/21) na Argentina através da IFI.

No presente estudo, a comparação entre a PCR desenvolvida, a técnica de isolamento e a IFI não foi possível, porém os resultados obtidos na PCR são semelhantes aos relatados através da detecção pela IFI. As desvantagens da IFI como a necessidade equipamentos e mão-de-obra especializados e a escassez de laboratórios capazes de produzir anticorpos específicos para o *A.suis*, tornam esta técnica pouco viável quando comparada à PCR. Atualmente, ferramentas

moleculares estão disseminadas na pesquisa e em laboratórios de diagnóstico veterinário, sendo consideradas acessíveis e de baixo custo.

O valor de Kappa encontrado foi de 0,358, indicando uma concordância muito pequena entre as duas técnicas empregadas neste estudo e ressaltando o quanto a PCR pode ser uma ferramenta eficiente em estudos epidemiológicos e para a detecção de *A.suis* em suínos quando comparado ao método tradicional de isolamento, o que inclusive pode também ser justificado pelo fato de a PCR ser capaz de detectar a bactéria mesmo quando esta não está viável.

6.3 Ocorrência de *A.suis* e outros agentes bacterianos

A ocorrência de urinas positivas para *A.suis* e outro agente simultaneamente (*E.coli*, *Streptococcus* sp e/ou *Staphylococcus* sp) foi de 3,1% (6/192). Este resultado é semelhante aos descritos por Wendt e Vesper (1992) e Alberton et al. (2000), que encontraram respectivamente 4,6% e 3,60% (63/1745) das urinas analisadas como positivas para algum agente bacteriano associado a *A.suis*. Dentre as 17 urinas positivas na PCR para *A.suis* neste estudo, 35,3% (6/17) foram também positivas para pelo menos um dos outros agentes pesquisados.

Estes resultados concordam com Alberton et al. (2000) que sugerem que possa existir competição entre a flora de origem fecal e o *A.suis*. Em contrapartida, Wendt e Vesper (1992) encontraram maior prevalência de *A.suis* em porcas provenientes de granjas com problema de infecção urinária associada a outros agentes, sugerindo que as condições para aderência do *A.suis* na mucosa da bexiga são melhores caso haja lesão prévia provocada por outras bactérias que estariam deste modo expondo receptores para ligação do *A.suis*.

Com relação às outras bactérias isoladas neste estudo, sem considerar a presença de *A.suis*, os principais agentes encontrados foram *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp e *Staphylococcus* sp. Estes resultados concordam com outras pesquisas realizadas no Brasil (SOBESTIANSKY; WENDT, 1993; REIS et al., 1992; PORTO et al., 2003; MENIN et al., 2008).

6.4 Susceptibilidade antimicrobiana

Os perfis de susceptibilidade antimicrobiana encontrados, tanto entre os isolados de machos como entre os de fêmeas, foram semelhantes entre si.

Com relação à classe dos beta lactâmicos, as cepas de machos e as de fêmeas foram sensíveis à penicilina, e ao ceftiofur, assim como relatado por outros autores (WEGIENEK; REDDY, 1982; SOBESTIANSKY et al., 1991; SOBESTIANSKY et al., 1995; ALBERTON; WERNER, 1998; BIKSI et al., 2003; TAYLOR, 2006).

A resistência das cepas diante das quinolonas não está de acordo do obtido por Wendt, Sobestiansky e Bollwahn (1993); Sobestiansky et al. (1995) e Biksi et al. (2003) que descreveram este agente como sensível a esta classe de drogas. A resistência observada no presente estudo pode estar relacionada ao uso frequente desses princípios no tratamento de infecções urinárias no Brasil (BARCELLOS; SOBESTIANSKY, 1998; MENIN et al., 2008).

Considerando os macrolídeos e lincosamidas, as amostras do presente estudo também apresentaram maior resistência do que relatado na literatura (WEGIENEK; REDDY, 1982; BIKSI et al., 2003). Essa discrepância pode estar relacionada ao uso destes princípios de modo profilático e como promotores de crescimento na suinocultura brasileira que pode ter contribuído para o aparecimento de resistência (GUARDABASSI; KRUSE, 2010).

As tetraciclinas constituem a classe de antimicrobianos quantitativamente mais usados em animais (GUARDABASSI; KRUSE, 2010), o que justificaria a resistência das cepas provenientes de machos, apesar de não estar de acordo com estudos previamente realizados (WEGIENEK; REDDY, 1982; SOBESTIANSKY et al., 1995; BIKSI et al., 2003; TAYLOR, 2006).

O cloranfenicol foi efetivo diante dos isolados de machos, porém os três isolados da fêmea com infecção urinária, utilizados como controle foram resistentes. Esta droga teve sua fabricação, comercialização e uso em animais proibidos pela Instrução Normativa nº9 de 2003 visando atender exigências de exportação impostas pela União Europeia. Apesar disto, o cloranfenicol apresenta um mecanismo de ação semelhante a outros princípios do mesmo grupo, como o florfenicol, justificando resistência das cepas das fêmeas, uma vez que este princípio

/ativo é muito utilizado no Brasil para controle das infecções urinárias em suínos (WEGIENEK; REDDY, 1982; SOBESTIANSKY; WENDT, 1993; BIKSI et al., 2003; MENIN et al., 2008).

A nitrofurantoína também mostrou ser uma alternativa eficaz para o tratamento de infecções com participação de *A.suis*, assim como o descrito na literatura. Entretanto, drogas da classe dos nitrofuranos foram proibidas para uso veterinário de acordo com a Instrução Normativa nº 9 de 2003 (SOBESTIANSKY; WENDT, 1993; SOBESTIANSKY et al., 1995; BARCELLOS; SOBESTIANSKY, 1998).

Outras drogas analisadas como quinupristin-dalfopristin, tigeciclina, vancomicina e linezolida apresentaram-se efetivas, apesar de não terem sido antes testadas no combate de infecções por *A.suis*. A daptomicina, droga também ainda não testada, não se mostrou promissora de acordo com este estudo, uma vez que todos os isolados foram resistentes.

Atualmente, o tratamento para as infecções de trato urinário consiste no uso das quinolonas, tetraciclina, fenicois e beta-lactâmicos. De acordo com os resultados apresentados neste estudo, apenas a classe dos beta-lactâmicos seria adequada quando existe a participação das bactérias pertencentes ao gênero *Actinobaculum* sp. Isto porque as outras classes citadas ou tiveram o seu uso proibido ou aumento de resistência ao longo dos últimos anos.

6.5 Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados

Até o momento não existem relatos referentes ao uso de métodos de tipificação genotípica em bactérias pertencentes ao gênero *Actinobaculum*.

Por outro lado, outros gêneros próximos filogeneticamente ao gênero *Actinobaculum* já foram submetidos a técnicas de tipificação molecular. A eletroforese em campo pulsado (PFGE), por exemplo, foi utilizada por Correia, Martin e Castro (1994); Connor et al. (2000) e Flores, Diedrick e Ferrieri (2011) para caracterização genotípica de *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Arcanobacterium haemolyticum*, respectivamente.

A técnica de AFLP foi descrita por De Zoysa e Efstratiou (2000) como uma técnica fácil, rápida, discriminatória e altamente reprodutível para a tipificação de *Corynebacterium diphtheriae*. De Zoysa et al. (2008) destacaram este método como mais rápido e reprodutível que a PFGE comparando estas duas técnicas na caracterização de *Corynebacterium diphtheriae*.

Neste estudo foram submetidas ao AFLP apenas 23 isolados de *Actinobaculum suis* e todos foram provenientes de criações de suínos localizadas no Brasil, o que implica em poucos dados disponíveis para inferir a respeito da variabilidade genética deste agente. Por outro lado, os 23 isolados foram oriundos de três diferentes localidades e não existiu a repetição de um mesmo perfil em origens distintas, o que sugere que deve ocorrer uma grande variabilidade genética deste agente e ressalta a necessidade de estudos epidemiológicos mais detalhados.

O AFLP dos isolados de machos teve perfil eletroforético diferente dos isolados de fêmeas. As estirpes de fêmeas foram provenientes de um mesmo animal e mostraram-se idênticas, porém não se deve considerar que os animais sejam infectados somente por populações clonais de *Actinobaculum suis*, uma vez que no caso das estirpes de machos foram observados perfis distintos em um mesmo animal.

Os perfis de susceptibilidade antimicrobiana das estirpes de fêmea foram idênticos reforçando o resultado fornecido pelo AFLP de que as três estirpes seriam clonais. Com referência aos machos, o AFLP não apresentou relação com a CIM, sendo que os agrupamentos evidenciados no dendograma tiveram maior relação com a granja de origem e com o animal, do que com os perfis de susceptibilidade antimicrobiana.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A PCR desenvolvida mostrou-se sensível e específica para o *A.suis*.
- ✓ A técnica de PCR foi mais eficaz que o isolamento na detecção de *A. suis* a partir de suabes prepuciais e urinas.
- ✓ Os perfis de susceptibilidade foram semelhantes entre as cepas provenientes de machos, porém mostraram diferenças com relação à cepa de fêmea LSS RG9-3.
- ✓ AFLP foi utilizado pela primeira vez na caracterização genotípica de cepas de *A.suis*, apresentando um resultado promissor com a discriminação das cepas de acordo com a origem e com o animal.

REFERÊNCIAS

AALVIK, B. *Corynebacterium suis* isolert fra et tilfelle av pyelonefritt hos purke. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 20, p. 319-320, 1968.

ALBERTON, G. C.; WERNER, P. R. Infecção urinária em porcas – revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 1, n. 1, p. 71-81, 1998.

ALBERTON, G. C.; WERNER, P. R.; SOBESTIANSKY, J.; COSTA, O. D.; BARIONI JÚNIOR, W. Prevalência de infecção urinária e de *Actinomyces suis* em porcas gestantes e sua correlação com alguns parâmetros físicos e químicos da urina. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 81-88, 2000.

BAHAMAN, A. R.; LEE, J. Y. S.; TOO, H. L. Isolation of *Corynebacterium suis* from boars in Selangor, Malaysia. **Pertanika**, v. 7, n. 3, p. 121-122, 1984.

BANK, S.; JENSEN, A.; HANSEN, T. M.; SOBY, K. M.; PRAG, J. *Actinobaculum schaalii*, a common uropathogen in elderly patients, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 76-80, 2010.

BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J. In: **Uso de antimicrobianos na suinocultura**. Goiânia: Art3 Impressos Especiais, 1998. 103 p.

BERNER, H.; BOLTZ, W.; MARX, U. D. Untersuchungen zur atologie der puerperalerkrankungen der sau unter berucksichtigung der erkrankung der harnwege. **Tierarztliche Umschau**, v. 23, n. 1, p. 51-25, 1968

BIKSI, I.; FODOR, L.; SZENCI, O.; VETESI, F. The First isolation of *Eubacterium suis* in Hungary. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 44, p. 547-550, 1997.

BIKSI, I.; MAJOR, A.; FODOR, L.; SZENCI, O.; VETESI, F. In vitro sensibility of Hungarian *Actinobaculum suis* strains to selected antimicrobials. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 51, p. 53-59, 2003.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 459-453, 1990.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa n.º 9, de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jun. 2003. Sec. 1, pt. 4.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Fifteenth Informational Supplement. Pennsylvania: CLSI, 2005. (M100-S15).

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**; approved standard. 7. ed. Pennsylvania: CLSI, 2007. (M11-A7, v. 27, n. 2).

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**; approved standard. 3ed. Pennsylvania: CLSI, 2008. (M31-A3).

CONNOR, K. M.; QUIRIE, M. M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2633-2637, 2000.

CORREIA, A.; MARTÍN, J. F.; CASTRO, J. M. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. **Microbiology**, v. 140, p. 2841-2847, 1994.

DAGNALL, G. J. R.; JONES, J. E. T. A selective medium for the isolation of *Corynebacterium suis*. **Research in Veterinary Science**, v. 32, p. 389-390, 1982.

DE ZOYSA, A.; EFSTRATIOU, A. Use of amplified fragment length polymorphisms for typing *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3843-3845, 2000.

DE ZOYSA, A.; HAWKEY, P.; CHARLETT, A.; EFSTRATIOU, A. Comparison of four molecular typing methods for characterization of *Corynebacterium diphtheriae* and determination of transcontinental spread of *C. diphtheria* based on BstEII rRNA Gne profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3626-3635, 2008.

DEE, S. A. Diagnosing and controlling urinary tract infections caused by *Eubacterium suis* in swine. **Veterinary Medicine**, v. 86, n. 2, p. 231-238, 1991.

DEE, S. A.; CARLSON, A. R.; COREY, M. M. New observations on the epidemiology of *Eubacterium suis*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, n. 2, p. 345-348, 1993.

DEE, S. A.; TRACY, J. D.; KING, V. Using citric acid to control urinary tract disease in swine. **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 5, p. 473-476, 1994.

EUCAST. Clinical Breakpoint Table: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, v. 2.0, 2012.

FERREIRA, M. E. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARRAY, I.; DIAS, B. F. S. **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001. p. 233-267.

FLORES, A. E.; DIEDRICK, M. J.; FERRIERI, P. Development of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method for molecular typing of clinical isolates of *Arcanobacterium haemolyticum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 387-389, 2011.

FRIJLINK, G. P. A.; VAN DIJK, J. E.; GOUDSWAARD, J. Een hemorragische-necrotiserende cystopyelonefritis bij een drachtige zeug, veroorzaakt door *Corynebacterium suis*. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 94 p. 389-393, 1969.

GIROTTI, A. F.; SOBESTIANSKY, J.; DALLA COSTA, O. A.; MATOS, M. P. C.; PÔRTO, R. N. G. **Avaliação econômica de alta prevalência de infecção urinária em matrizes em um sistema intensivo de produção de suínos**. Concórdia: EMBRAPA-CNPAS, 2000. 4 p. (Comunicado técnico nº 259).

GLAZEBROOK, J. S.; DONALDSON-WOOD, C.; LADDS, P. W. Pyelonephritis and cystitis in sows associated with *Corynebacterium suis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, p. 546, 1973.

GOLDBERG, A. M. G. **Manual de urinálise suína: da coleta à análise dos resultados**. 2007. 78 f. Monografia (Especialização em Análises Clínicas Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GREUB, G.; RAOULT, D. “*Actinobaculum massiliae*” a new species causing chronic urinary tract infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3938-3941, 2002.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 17-30.

HALL, V.; COLLINS, M.D.; HUTSON R. A.; FALSEN E.; INGANÄS E.; DUERDEN B. I. *Actinobaculum urinale* sp. nov., from human urine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 679-682, 2003.

HAMPSON, D. J.; STEPHENS, C. P.; OXBERRY, S. L. Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. **Avian Pathology**, v. 35, n. 1, p. 12-16, 2006.

HOGH, P.; BOLM, E.; LARSEN, U. J. L. *Corynebacterium suis* – infection in Danish pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 8., 1984, Ghent. **Proceedings...** Ghent: IPVS, 1984. p. 150.

HUNT, M. L.; ADLER, B.; TOWNSEND, K. M. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 3-25, 2000.

JONES, J. E. T.; DAGNALL, G. J. R. The carriage of *Corynebacterium suis* in male pigs. **The Journal of Hygiene**, v. 93, p. 381-388, 1984.

KAUKO, L.; SCHILDT, R.; SANDHOLM, M. *Corynebacterium suis* emakoiden pyelonefritin aiheuttajana suomessa. **Suom Elainl**, v. 83, p. 489-492, 1977.

KOLLER, F. L.; BARCELLOS, D.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. Prevenção e tratamento da infecção urinária em matrizes suínas. **Suínos.com**, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <http://www.suinos.com.br>. Acesso em: 02 maio 2010.

LANGFELDT, N.; WENDT, M.; AMTSBERG, G. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Corynebacterium suis* - Infektion beim Schwein mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und der Kultur. **Berliner Munchner Tierärztliche Wochenschrift**, v. 103, p. 273-276, 1990.

LARSEN, J. L. *Corynebacterium suis* infektioner hos svin. **Nordish Veterinaermedicin**, v. 22, p. 422-431, 1970.

LARSEN, J. L.; HOGH, P.; HOVIND-HOUGEN, K. Haemagglutinating and hydrophobic properties of *Corynebacterium (Eubacterium) suis*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, p. 520-530, 1986.

LAWSON, P. A.; FALSEN, E.; AKERVALL, E.; VANDAMME, P.; COLLINS, M. D. Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 899-903, 1997.

LIEBHOLD, M.; WENDT, M.; KAUP, F. J.; DROMMER, W. Clinical, and light and electron microscopical findings in sows with cystitis. **Veterinary Record**, v. 137, p. 141-144, 1995.

LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G.; WEIZENEGGER, M.; WEISS, N. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium suis* to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces suis* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 161-165, 1992.

MADEC, F.; DAVID, F. Les troubles urinaires des troupeaux de truies: Diagnostic, incidence et circonstances d'apparition. **Journées Recherche Porcine France**, v. 15, p. 431-446, 1983

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MEISTER, R. A. **Efeitos do cloreto de amônio, ácido cítrico e cloreto de sódio no controle de cistites em porcas**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

MENIN, A.; RECK, C.; CAPELLI, J. C.; FERRAZ, S. M.; VAZ, E. K. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 199-206, 2008.

MEREDITH, M. J. **Animal health & production compendium**: Pictures. Disponível em: <<http://www.cabi.org/compendia/ahpc/>>. Acesso em: 16 fev. 2010.

MUNRO, R.; WONG, F. First isolation of *Corynebacterium suis* in Hong Kong. **British Veterinary Journal**, v. 128, p. 29-32, 1972.

OLIVEIRA, S. J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; BAROWSKI, S. M. Presença de portadores de *Corynebacterium suis* em suínos machos abatidos em frigoríficos, no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES, 1., 1983, Concordia. **Anais...** Concordia: EMBRAPA-CNPSA, 1983. p. 823-826.

OLIVEIRA, S. J.; BARCELOS, D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M. Urinary tract infections in two pig breeding herds, with emphasis on the presence of *Corynebacterium suis*. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 10., 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: IPVS, 1988. p. 304.

PERCY, D. H.; RUHNKE, H. L.; SOLTYS, M. A. A case of infectious cystitis and pyelonephritis of swine caused by *Corynebacterium suis*. **Canadian Veterinary Journal**, v. 7, p. 291-292, 1966.

PERESTRELO, R.; SOBESTIANSKY, J.; PERESTRELO, H.; WENDT, M.; FERREIRA, C. Primeiro diagnóstico de *Eubacterium suis* em Portugal. Estudo da prevalência em machos da espécie suína. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 88, n. 505, p. 43-44, 1993.

PIJOAN, C.; LASTRA, A.; LEMAN, A. Isolation of *Corynebacterium suis* from the prepuce of boars. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 4, p. 428-429, 1983.

PLESCHAKOWA, V.; LEIBOLD, W.; AMTSBERG, G.; KONINE, D.; WENDT, M. The prevalence of *Actinobaculum suis* in boars of breeding herds in the Omsk region (Russian Federation) by indirect immunofluorescence technique. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrifte**, v. 111, n. 2, p. 67-69, 2004.

PORTO, R. N. G.; SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M. P. C.; GAMBARINI, M. L. Aspectos físico, químicos e microbiológicos da urina de matrizes suínas descartadas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 319-324, 2003.

REIS, B. S.; NAKAJIMA, M.; NASCIMENTO, E. F.; FERRAZ, I. B. F.; LEITE, R. C. Infecções urinárias em porcas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 5, p. 363-376, 1992.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; DE HAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083-3091, 1999.

SCHAAL, K. P.; YASSIN, A. F.; STACKEBRANDT, E. The family Actinomycetaceae: The genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes** 3. ed. New York: Springer, 2006. p. 430-537.

SCHALLIBAUM, M. VON; HANI, H.; NICOLET, J. Infektion des harntraktes beim schwein mit *Corynebacterium suis*: Diagnosis met Immunofluoreszenz. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 118, p. 329-334, 1976.

SMITH, R. D. **Veterinary clinical epidemiology**. London: CRC Press, 1995. 279 p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: Art.3 Impressos Especiais, 1999. 464 p.

SOBESTIANSKY, J.; WENDT, M. Infecção urinária na fêmea suína: epidemiologia, sintomatologia, diagnóstico e controle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6., 1993, Goiânia. **Anais...** Goiânia: ABRAVES, 1993. p. 51-63.

SOBESTIANSKY, J.; MORES, N.; VIEIRA, R. A. P.; SOBESTIANSKY, A. A. B.; VIEIRA, H. P.; WENDT, M.; LIEBHOLD, M. M. **Infecções urinárias na fêmea suína**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1991. 49 p. (Circular técnica nº 11).

SOBESTIANSKY, J.; WENDT, M.; PERESTRELO, R.; AMBROGI, A. Studies on the prevalence of *Eubacterium suis* in boars on farms in Brazil, Portugal and Argentina by indirect immunofluorescence technique. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrifte**, v. 100, n. 12, p. 463-464, 1993.

SOBESTIANSKY, J.; PERUZO B. F.; DALLA COSTA, O.; WENDT, M. **Infecção urinária de origem multifatorial na fêmea suína em produção**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1995. 9 p. (Comunicado técnico nº 16).

SOLTYS, M. A.; SPRATLING, F. R. Infectious cystitis and pyelonephritis of pigs: a preliminary communication. **Veterinary Record**, v. 69, p. 500-504, 1957.

TAYLOR, D. J. Miscellaneous bacterial infections (*Actinobaculum suis*). In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine** 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 2006. p. 837-839.

VAZ, E. K.; SOBESTIANSKY, J.; BRUM, S. M.; ZAGO, E. C.; TONNEMANN, M. E. V. Ocorrência de *Actinomyces suis* em fêmeas em produção provenientes de granjas com transtornos reprodutivos localizadas no planalto catarinense – Santa Catarina. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 447-449, 1997.

WALKER, R. L.; MACLACHLAN, J. J. Isolation of *Eubacterium suis* from sows with cystitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, p. 1104-1107, 1989.

WALKER, R. L.; GREENE, R. T.; GERIG, T. M. Evaluation of four commercial anaerobic systems for identification of *Eubacterium suis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 318-322, 1990.

WEGIENEK, J.; REDDY, C. A. Taxonomic study of "*Corynebacterium suis*" Soltys and Spratling: proposal of *Eubacterium suis* (nom. rev.) comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 218-228, 1982a.

WEGIENEK, J.; REDDY, C. A. Nutritional and metabolic features of *Eubacterium suis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 15, n. 5, p. 895-901, 1982b.

WENDT, M.; VESPER, C. Occurrence of *Eubacterium suis* in breeding herds. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: IPVS, 1992. p. 349.

WENDT, M.; SOBESTIANSKY, J.; AMTSBERG, G. Infecções urinárias em suínos: identificação de *Eubacterium suis* por imunofluorescência directa. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 88, n. 508, p. 176-180, 1993.

WENDT, M.; SOBESTIANSKY, J.; BOLLWAHN, W. Infecções urinárias em suínos: estudo sobre o tratamento de machos infectados por *Eubacterium suis*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 88, n. 508, p. 182-185, 1993.

WOLDEMESKEL, M.; DROMMER, W.; WENDT, M. Microscopic and ultrastructural lesions of the ureter and renal pelvis in sows with regard to *Actinobaculum suis* Infection. **Journal of Veterinary Medicine, Series A**, v. 49, p. 348-352, 2002.