

Padronização da técnica de nanopartícula de ouro não modificada (AuNPs) para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em pulmões de suínos¹

Laila Natasha S. Brandão², Letícia C. Pitchenin², Fernanda H. Maruyama³, Cristiane S. Chitarra², Givago F.R. da Silva², Cátia Klein⁴, Luciano Nakazato⁵ e Valéria Dutra^{5*}

ABSTRACT.- Brandão L.N.S., Pitchenin L.C., Maruyama F.H., Chitarra C.S., Silva G.F.R., Klein C., Nakazato L. & Dutra V. 2014. [Standardization of unmodified gold nanoparticle (AuNPs) for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine lungs.] Padronização da técnica de nanopartícula de ouro não modificada (AuNPs) para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em pulmões de suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(7):621-625. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brazil. E-mail: valdutra@ufmt.br

Based on diagnostic tests for the detection of nucleic acids without amplification through the use of gold nanoparticles (AuNPs) have been described for various diseases. This study aimed to develop a technique of unmodified AuNPs to detect *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*). We used 70 lung samples from pigs, 17 with and 53 without characteristic lesions of pneumonia, to detect *App*. The primer used was based on *ApxIV* gene. The AuNPs test had a sensitivity of 93.8% and specificity of 84.6% when compared with PCR detection. The results showed good agreement between AuNPs and PCR testing, and the technique can be used as an alternative to conventional tests, since it is quick and easy, and does not require implementation infrastructure and skilled labor.

INDEX TERMS: Swine pneumonia, gold nanoparticle, AuNP, *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

RESUMO.- Testes diagnósticos baseados na detecção de ácidos nucleicos sem amplificação prévia através da utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido descritos para várias enfermidades. Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma técnica de AuNPs não modificada para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*). Utilizaram-se 70 amostras de pulmão de suínos, 17 sem lesão e 53 com lesões características de pneumonia, ob-

jetivando a detecção de *App*. O oligonucleotídeo utilizado foi baseado no gene *ApxIV*. O teste de AuNPs apresentou sensibilidade de 93,8% e especificidade de 84,6% quando comparado com a detecção pela PCR. Os resultados mostraram boa concordância entre os testes de AuNPs e a PCR, sendo que a técnica pode ser utilizada como alternativa aos testes convencionais, já que é de fácil e rápida execução e não exige infraestrutura e mão de obra especializada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pneumonia suína, nanopartícula de ouro, AuNP, *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

INTRODUÇÃO

A produção de carne suína no Brasil é altamente tecnificada e com certificação sanitária. Propriedades pequenas, médias e integradas a grandes empresas são as formas mais comuns de criação. O rebanho brasileiro de suínos é o quarto rebanho mundial, atingindo 38,9 milhões de cabeças em 2011. A produção de carne suína está próxima a 3,4 milhões de toneladas/ano. O consumo *per capita* em 2011 chegou a 14,88 kg, um aumento de 11,42% em relação ao

¹ Recebido em 6 de junho de 2014.

Aceito para publicação em 7 de maio de 2014.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET), Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia (Famevz), Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900, Brasil.

³ Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, UFMT, Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900.

⁴ Embrapa Suínos e Aves, Cx. Postal 21, Concordia, SC 89700-000, Brasil.

⁵ Docente do Departamento de Clínica Médica Veterinária, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, UFMT, Av. Fernando Corrêa da Costa 2367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT 78060-900. *Autor para correspondência: valdutra@ufmt.br

ano de 2010 e o número de animais abatidos nos primeiros dois trimestres de 2013 foi de 17.911 cabeças segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013).

Dentre os complexos patológicos que afetam os suínos, as doenças respiratórias apresentam destaque, devido à frequência e intensidade com que atingem rebanhos (Rossi et al. 2013). São consideradas doenças multifatoriais, provocando significativas perdas econômicas, geralmente associadas à produção intensiva, a fatores ambientais e de manejo (Hansen et al. 2010, Opriessnig, Gimenez-Lirola & Halbur 2011). O diagnóstico baseia-se no isolamento do agente a partir de lesões suspeitas e, principalmente, em testes sorológicos para estabelecimento de medidas de controle (Coelho et al. 2004, Xie et al. 2013).

A pleuropneumonia suína (PPS) causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*), provoca doença clínica caracterizada por pneumonia com pleurisia fibrinosa, lesões pulmonares necrohemorrágicas, adesões pleurais fibrinóticas e, em casos severos, à morte (Bossé et al. 2002). O contágio geralmente ocorre após inalação de aerossóis ou contato direto, o microrganismo inalado coloniza o tecido pulmonar aderindo-se ao muco, proteínas e a células hospedeiras com posterior multiplicação no local (Chiers et al. 2010). O monitoramento do *status* da doença em rebanhos, o controle e a erradicação são de fundamental importância devido a características de contágio rápido deste agente, para impedir que animais portadores sejam introduzidos em rebanhos saudáveis (Tremblay et al. 2013).

Testes indiretos são muito utilizados (Machado et al. 2001, Shin et al. 2011, Eamens et al. 2012a,b, Gimenez-Lirola et al. 2014), para detecção simultânea de anticorpos para toxinas com sensibilidade de 82,7% e especificidade de 100% (Gimenez-Lirola et al. 2014). São descritos testes de ELISA monovalentes e polivalentes para sorotipos, com sensibilidade e especificidade variando de 88,3% a 96,6% (Machado et al. 2001). A importância de alta sensibilidade e especificidade em testes diagnósticos é fundamental para monitoramento dos rebanhos.

Várias técnicas moleculares têm sido empregadas nos últimos anos para a detecção de *App* (Schaller et al. 2001, Souza et al. 2008, Hricinova et al. 2010, Rossi et al. 2013). Métodos que detectam o Ácido Desoxirribonucléico (DNA), como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são altamente sensíveis e de importância para diagnóstico, principalmente para microrganismos de cultivo fastidioso.

No PCR para *App* os genes alvos geralmente selecionados para a técnica apresentam intrínseca relação com outras espécies, como *Actinobacillus* sp., *A. equuli*, *A. lignieresii*, e *A. suis* (Xiao et al. 2006). O gene específico *omlA* em diferentes grupos de *App* se assemelha ao gene *Apx*, ambos utilizados para a identificação da espécie de *App* (Klein et al. 2003). O gene *ApxIVA* é específico para *App*, não sendo compartilhado nas demais espécies da família Pasteurellaceae (Schaller et al. 2001). Apesar das técnicas moleculares proporcionarem resultados rápidos, necessitam de investimentos em equipamentos e infraestrutura laboratorial, sendo inviável a realização das mesmas a campo, que representa dificuldades como o envio de material em condições ideais muitas vezes inviabilizando o cultivo do

agente, principalmente no caso das doenças respiratórias suínas.

Recentemente, métodos diagnósticos baseados em AuNPs tem sido utilizados para uma rápida e sensível detecção direta de microrganismos, entre eles: *Mycobacterium* sp. (Baptista et al. 2006, Liandris et al. 2009, Hussain et al. 2013), *Escherichia coli*, com detecção de 54 nanogramas (ng) de DNA não amplificado e com 100% de sensibilidade (Bakthavathsalam et al. 2012), RNA de vírus da dengue com detecção de 1×10^1 TCID₅₀ unidade (Carter et al. 2013) e *Leishmania* sp. com valores de detecção de 11,5ng à 50ng DNA e sensibilidade de 56% à 92% (Rosa et al. 2013, Andreadou et al. 2014).

O presente trabalho objetiva a padronização da técnica de AuNPs para detecção de *App*, em amostras clínicas de suínos com pneumonia.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. As amostras testadas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso e foram coletadas entre os anos de 2010 a 2013 originárias de diferentes regiões do estado de Mato Grosso. Foram testadas 70 amostras de pulmões de suínos, sendo 53 com lesões macroscópicas características de pneumonia (consolidação pulmonar, deposição de fibrina na pleura, pleurite ou aderência) e 17 sem lesões macroscópicas de animais em fase de terminação e abate.

Os controles positivos para a padronização do teste foram DNAs extraídos de cultivos de *App* sorotipos 3 e 5, e de *Haemophilus parasuis*, cedidos pelo Centro Nacional de Suínos e Aves-Embrapa e *Pasteurella multocida* proveniente de cultura no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso confirmada por PCR e sequenciamento para o gene *kmt1*. O DNA de *Escherichia coli* ATCC 35218 e água ultra-pura foram utilizados como controles negativos.

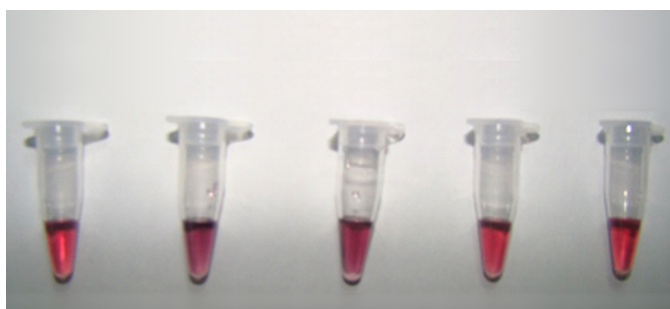
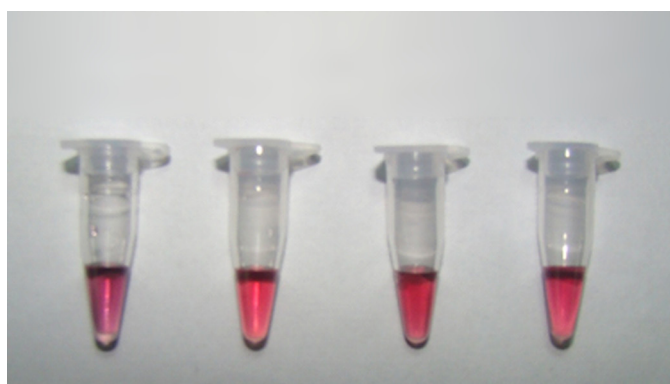
Extração de DNA e PCR. A extração de DNA genômico das amostras de pulmões foi realizada segundo Sambrook & Russel (2004) utilizando-se fenol e clorofórmio, com mínimas modificações (não utilização de álcool isoamílico). A realização dos testes de PCR para os microrganismos foram executadas de acordo com Xiao et al. (2006) para *App*, Townsend et al. (2001) para *P. multocida* e Angen et al. (2007) para *H. parasuis*. Os oligonucleotídeos e tamanho dos *amplicons* encontram-se no Quadro 1. A qualidade e integridade do DNA e os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel agarose 1,0%, corado com *Gel Red™* (*Biotium®*) a 100 Volts por centímetro e observados em ChemiDoc™ XRS utilizando o software Image Lab™ Software. Como marcador de massa molecular utilizou-se o padrão de 100 pares de base (pb) de DNA Ladder™ (Fermentas®).

Preparação de AuNPs. Seguiu-se o método de redução de citrato segundo descrito por Grabar et al. (1995) que torna as partículas negativamente carregadas. Um volume de 250 ml de cloreto de ouro (HAuCl₄ACl) a 1Mm foi levado à fervura sob agitação e posteriormente foi acrescido nitrato de sódio na concentração de 38,8mM e mantido por agitação contínua durante 15 minutos (min). A solução estoque foi mantida a 4°C e a solução em uso se manteve estável por três meses a temperatura ambiente.

Teste de AuNP. A hibridização foi realizada conforme descrito por Bakthavathsalam, Rajendran & Mohammed (2012), a desnaturação do DNA genômico, sem prévia amplificação através de PCR, ocorreu a 95°C por 3min em solução contendo 1,25 M de

Quadro 1. Oligonucleotídeos e genes alvos utilizados na PCR e tamanhos de amplicons

Agente	Primer	Sequência	Gene alvo	(pb)	Autores
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	apxIV F	ATACGGTTAATGCGCGTAATGG	apxIVA	346	(Xiao et al. 2006)
	apxIV R	ACCTGAGTGCTCACCAACG			
<i>Haemophilus parasuis</i>	HP1F3	TATCGRGAGATGAAAGAC	16s rDNA	1090	(Angen et al. 2007)
	HP2F2	GTAATGTCTAAGGACTAG			
	Revx	CCTGGCTTCGTC			
<i>Pasteurella multocida</i>	KMT1T7	ATCCGCTATTACCCAGTGG	kmt1	460	(Townsend et al. 2001)
	KMT1SP6	GCTGTAAACGAACCTGCCAC			

Fig.1. Limite de detecção de DNA de *App* pelo teste de AuNP's. Água, 649ng; 129,8ng; 25,6ng; 5,19ng, nesta ordem.Fig.2. Especificidade do teste de AuNP com DNA de *App*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida*, nesta ordem.

NaCl, 20 mM de Tris, 70pMol do oligonucleotídeo *apxIV R*, que posteriormente foi resfriada para a 50°C por 2 min para permitir a hibridização com o iniciador. Imediatamente submeteu-se a reação ao resfriamento até que atingisse 4°C e adicionou-se 50µl do preparado de AuNPs.

As leituras das amostras foram realizadas de acordo com Hussain et al. (2013). O ponto de corte foi baseado na quantidade mínima de DNA capaz de induzir colorimetricamente (visualmente) as AuNPs de rosa (negativo) para roxo (positivo) e pela relação de suas respectivas leituras de densidade ótica a 520 e 600nm (OD). Os valores da relação de leitura acima de 0,5 foram considerados positivos e valores inferiores negativos (Hussain et al. 2013). A visualização macroscópica dos resultados foi possível 1 minuto após acréscimo da AuNPs. Os limites de detecção foram obtidos a partir de diluições seriadas dos DNAs de *App* sorotipos 3 e 5 e o controle negativo consistiu em H₂O ultra pura. As imagens foram obtidas com câmera digital.

Análise estatística. A análise estatística foi realizada através do software R (R 2011) utilizando o pacote de dados Rcmdr (Fox 2005), para determinação da sensibilidade e especificidade da técnica e o teste Kappa para análise de concordância entre a técnica de PCR e as AuNPs.

RESULTADOS

O limite de detecção de DNA de amostras de *App* sorotipos 3 e 5 estão descritos no Quadro 4. O menor nível de detecção foi de 129ng de DNA pelas avaliações macroscópica e relação OD_{520/600nm} (0,55) (Fig.1). Não ocorreram alterações de coloração macroscopicamente e na leitura de OD para DNAs de outras bactérias como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Escherichia coli* (Fig.2).

A detecção dos patógenos bacterianos respiratórios das amostras de pulmões pelo PCR está apresentada no Quadro 2. A presença de *App* foi detectada em 16 (22,85%) das 70 amostras testadas. Destas, 8 (50%) foram de pulmões com lesão e 8 (50%) de pulmões sem lesão.

Na detecção de *App* pela técnica de AuNPs em pulmões, 23 amostras (32,8%) foram positivas no teste, sendo 13 (24,5%) com lesões e 11 (64,7%) sem lesões (Quadro 3). Utilizando-se a técnica de PCR como padrão ouro obteve-se uma sensibilidade de 93,8% e uma especificidade de 84,6% para AuNPs. A concordância entre PCR e AuNPs foi boa com índice Kappa de 0,684 (Quadro 5).

Quadro 2. Relação do total de amostras positivas e negativas para cada agente testado na PCR

Microrganismo	Amostras	PCR			
		Negativo (%)		Positivo (%)	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Com lesão	45	84,91	8	15,09
	Sem lesão	9	52,95	8	47,05
	TOTAL	54	77,15	16	22,85
<i>Haemophilus parasuis</i>	Com lesão	45	84,91	8	15,09
	Sem lesão	9	52,95	8	47,05
	TOTAL	54	77,15	16	22,85
<i>Pasteurella multocida</i>	Com lesão	40	75,47	13	24,52
	Sem lesão	17	100	0	0
	TOTAL	57	81,42	13	18,57

Quadro 3. Número de amostras positivas e negativas nas AuNPs

	Macroscopia		O.D.		PCR <i>App</i>	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	Positiva	Negativa
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
Com lesão	13 24,5	40 75,5	13 24,5	40 75,5	8 15,1	45 84,9
Sem lesão	10 58,8	7 41,2	11 64,7	6 35,3	8 47,1	9 52,9
TOTAL	23 32,8	47 67,2	24 34,3	46 65,7	16 22,9	54 77,1

Quadro 4. Diluições seriadas de DNA de App

Diluições	Concentração do DNA	Macroscopia	Relação da O.D.
1.Sorotipo 3	649 ng	Positivo	0,605
2.Sorotipo 3	129,8ng	Positivo	0,558
3.Sorotipo 3	25,6ng	Negativo	0,447
4.Sorotipo 3	5,192ng	Negativo	0,415
5.H2O	-	Negativo	0,415

Quadro 5. Teste de sensibilidades especificidade das amostras

Amostras	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
Com lesão	87,5%	86,7%	0,590
Sem lesão	100%	77,80%	0,767
TOTAL	93,8%	84,6%	0,684

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A nanociência tem tido inúmeras aplicações, soluções coloidais de metais podem ser facilmente preparadas e modificadas quimicamente, uma diversidade de cores pode ser observada relacionada às oscilações dos elétrons de condução em ressonância a luz incidente, desde que haja elétrons livres de condução (Melo Jr et al. 2012). A técnica de AuNPs tem sido utilizada para diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* (Hussain et al. 2013), câncer de bexiga (Nossier et al. 2014), *Leishmania* sp. (Andreadou et al. 2014) e vírus da dengue (Carter et al. 2013). A detecção do DNA é baseada na adsorção das bases nitrogenadas aos oligonucleotídeos e a superfície das AuNPs. A agregação ocorre devido a presença de sal durante a hibridização, ocorrendo a atração e a agregação das AuNPs devido as cargas negativas que interagem com os cátions do sal. A coloração visual muda do vermelho para o azul na ausência do DNA alvo porque não ocorre a agregação (Hussain et al. 2013). A concentração, tamanho e temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados, a concentração de sal e de nanopartículas são fatores que podem interferir nos resultados desta técnica.

O limite mínimo de detecção das AuNPs foi de 129,8ng de DNA genômico de *App* não amplificado, sendo o limite mínimo detectado por PCR com os mesmos oligonucleotídeos de acordo com Xiao et al. (2006) de 10 picogramas (pg) para DNA amplificado. Chan et al. (2014) obtiveram em amostras de PCR amplificado para genes de resistência à metilina em *Staphylococcus aureus* um valor para limite de detecção das AuNPs de 500ng e Hussain et al. (2013) valores de DNA não amplificado de 40ng, utilizando a técnica de nanopartículas de ouro sem adição do grupo tiol, uma pequena modificação nos oligonucleotídeos. A maior concentração de agentes no tecido estudado pode ser o motivo da maior sensibilidade encontrada neste estudo e em trabalhos, como o de Andreadou et al. (2014) que descrevem como valores mínimos de detecção de DNA de *Leishmania* sp. 11,5ng e Bakthavathsalam et al. (2012) que encontraram valor mínimo de detecção de 54ng de DNA de *Escherichia coli*. A funcionalização da AuNPs com oligonucleotídeos tiol modificados conduziu a primeira aplicação de AuNPs na detecção de ácidos nucleicos. O uso de técnicas utilizando ouro para detecção de *App* foi primeiramente descrito no ano de 2009, porém, o diagnóstico se baseava em detecção por fluorescência de anticorpo específico para a toxina *ApxIV*, com sensibilidade de 87,5% e especificidade de 92,9% (Sheng et al. 2009).

Usando-se a detecção do DNA genômico não amplificado, extraído diretamente do pulmão de suínos com e sem sinais clínicos o teste apresentou sensibilidade de 93,8% e especificidade 84,6%, sendo o valor kappa 0,684 demons-

trando boa concordância. No grupo dos animais sem lesão macroscópica de pneumonia alcançou-se a sensibilidade de 100%, entretanto a especificidade foi inferior a 80% e o teste kappa 0,767 indicando ótima concordância entre os testes de PCR e AuNP. A concordância entre os testes nos animais com lesão foi de 0,590, sendo considerada boa. Os valores de sensibilidade e especificidade foram de 87,5% e 86,7%, respectivamente. A utilização de DNA não amplificado pode gerar interferências nos testes moleculares, porém as reações cruzadas são menos frequentes do que nos testes sorológicos. Apesar das semelhanças genéticas entre os microrganismos que causam as doenças do complexo respiratório, pertencentes à família Pasteurellaceae, entre eles: *App*, *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida* (Hansen et al. 2010, Fablet et al. 2012) e ainda os microrganismos *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Streptococcus suis*, a escolha dos oligonucleotídeos e dos genes alvos para os testes pode diminuir essas reações cruzadas.

A maior parte das técnicas moleculares e sorológicas exige algum grau de tecnificação por parte do local de realização e mão de obra capacitada, entretanto a técnica descrita neste trabalho pode ser aplicável em locais com menor infraestrutura, onde o uso de termociclador pode ser substituído por equipamentos mais simples e mais baratos, capazes de oscilar a temperatura como o banho-maria. A preparação das nanopartículas deve ser realizada em laboratório, entretanto apenas um agitador magnético com aquecimento se faz necessário. A solução estoque se mantém estável a 4°C em geladeiras convencionais, por tempo indeterminado e a solução de uso pode ser mantida em temperatura ambiente em torno de três meses, observando-se nesse tempo apenas a precipitação do soluto que inviabiliza seu uso. A campo, a utilização desta técnica representaria a possibilidade de detectar animais doentes com mais agilidade, pois o uso de kits comerciais de extração de DNA são facilmente obtidos, com custos variados, e de fácil manuseio, permitindo inibir a disseminação do agente, já que ocorre de forma rápida por aerossóis. O *App* é um importante microrganismo em doenças respiratórias de suínos, de cultivo fastidioso e oneroso. A técnica de PCR tem sido bastante utilizada no diagnóstico deste agente, porém, a técnica de AuNP permite a detecção do mesmo sem amplificação prévia do DNA, o que permite uma detecção rápida com custo reduzido.

Agradecimentos. - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (Fapemat).

REFERÊNCIAS

- Andreadou M., Liandris E., Gazouli M., Taka S., Antoniou M., Theodoropoulos G., Tachtsidis I., Goutas N., Vlachodimitropoulos D., Kasampalidis I. & Ikononopoulos J. 2014. A novel non-amplification assay for the detection of *Leishmania* spp. in clinical samples using gold nanoparticles. J. Microbiol. Methods 96:56-61.
- Angen O., Oliveira S., Ahrens P., Svensmark B. & Leser T.D. 2007. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. Vet. Microbiol. 119(2/4):266-276.
- Bakthavathsalam P., Rajendran V.K. & Mohammed J.A.B. 2012. A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobos. J. Nanobiotechnol. 10(8):1-10.

- Baptista P.V., Koziol-Montewka M., Paluch-Oles J., Doria G. & Franco R. 2006. Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clin. Chem.* 52:1433-1434.
- Bossé J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S. & Langford P.R. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 4(2):225-235.
- Carter J., Velmurugan B., Cheryl K., Tresa F. & Malcolm F. 2013. A novel dengue virus detection method that couples DNzyme and gold nanoparticle approaches. *Virology J.* 10(201):1-15.
- Chan W.S., Tang B.S., Boost M.V., Chow C. & Leung P.H. 2014. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a gold nanoparticle-based colourimetric polymerase chain reaction assay. *Biosens. Bioelectron.* 53:105-111.
- Chiers K., De Waele T., Pasmans F., Ducatelle R. & Haesebrouck F. 2010. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.* 41(65):1-19.
- Coelho A.C., Vieira-Brito F.J., Vieira-Brito M.G. & Rodrigues J. 2004. Swine pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: diagnosis and strategies of control. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 99(552):193-198.
- Eamens G.J., Gonsalves J.R., Whittington A.M. & Turner B. 2012a. Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs following vaccination or experimental challenge with respiratory pathogens and natural *A. pleuropneumoniae* serovar 1 challenge. *Aust. Vet. J.* 90(12):490-498.
- Eamens G.J., Gonsalves J.R., Whittington A.M. & Turner B. 2012b. Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, following experimental challenge with *A. pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Aust. Vet. J.* 90(6):225-234.
- Fablet C., Marois C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Jolly J.P., Le Devendec L., Kobisch M., Madec F. & Rose N. 2012. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res. Vet. Sci.* 93(2):627-630.
- Fox, J. 2005. The R Commander: a basic statistics graphical user interface to R. *J. Stat. Softw.* 14(9):1-42
- Gimenez-Lirola L.G., Jiang Y.H., Sun D., Hoang H., Yoon K.J., Halbur P.G., Opriessnig T. & Litwin V.M. 2014. Simultaneous Detection of Antibodies against Apx Toxins ApxI, ApxII, ApxIII, and ApxIV in Pigs with Known and Unknown *Actinobacillus pleuropneumoniae* Exposure Using a Multiplexing Liquid Array Platform. *Clin. Vaccine Immunol.* 21(1):85-95.
- Grabar K.C., Freeman R.G., Hommer M.B. & Natan M.J. 1995. Preparation and characterization of Au colloid Monolayers. *Anal. Chem.* 67(4):735-743.
- Hansen M.S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M. & Nielsen O.L. 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J. Comp. Pathol.* 143(2/3):120-131.
- Hricinova M., Holoda E., Mudronova D. & Ondrasovicova S. 2010. Multiplex PCR assay for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* in lungs of pigs from a slaughterhouse. *Folia Microbiol., Praha,* 55(6):635-640.
- Hussain M.M., Samir T.M. & Azzazy H.M. 2013. Unmodified gold nanoparticles for direct and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clin. Biochem.* 46(7/8):633-637.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2013. Estatística da Produção Pecuaría, junho de 2013. , Indicadores IBGE. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_publicacao_completa.pdf> Acesso em dezembro de 2013.
- Klein C.S., Piffer I.A., Silva S.C., Schrank A., Favero M.B. & Schrank I.S. 2003. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field strains from healthy and diseased pigs. *Curr. Microbiol.* 46(6):443-447.
- Liandris E., Gazouli M., Andreadou M., Comor M., Abazovic N., Sechi L.A. & Ikonopoulou J. 2009. Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA-derivatized gold nanoparticles. *J. Microbiol. Methods* 78(3):260-264.
- Machado H.G., Piffer I.A., Guidoni A.L., Klein C. & Gil-Turnes C. 2001. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53:513-522.
- Melo Jr, Alves M., Santos L.S.S., Gonçalves M.C. & Nogueira A.F. 2012. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Quim. Nova* 35:1872-1878.
- Nossier A.I., Eissa S., Ismail M.F., Hamdy M.A. & Azzazy H.M. 2014. Direct detection of hyaluronidase in urine using cationic gold nanoparticles: A potential diagnostic test for bladder cancer. *Biosens. Bioelectron.* 54:7-14.
- Opriessnig T., Gimenez-Lirola L.G. & Halbur P.G. 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health Res. Rev.* 12 (2):133-148.
- R Core Team 2011. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<http://www.R-project.org/>>
- Rosa J.M.A., Almeida A.B.P.F., Tavares R.C., Brandão L.N.S., Pitchenin L.C., Rocha I.S.M., Sousa V.R.F., Dutra V. & Nakazato L. 2013. Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina através da técnica de sonda de nanopartículas de ouro (AuNPprobes). *Semina, Ciênc. Agrárias* 34(6:2):3777-3786.
- Rossi C.C., Pereira M.F., Langford P.R. & Bazzoli D.M. 2013. A BOX-SCAR fragment for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 353:32-37.
- Sambrook J. & Russel D.W. 2004. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.5.65-5.67.
- Schaller A., Djordjevic S.P., Eamens G.J., Forbes W.A., Kuhn R., Kuhnert P., Gottschalk M., Nicolet J. & Frey J. 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA. *Vet Microbiol.* 79(1):47-62.
- Sheng Z., Han H., Hu D., Liang J., He Q., Jin M., Zhou R. & Chen H. 2009. Quantum dots-gold(III)-based indirect fluorescence immunoassay for high-throughput screening of APP. *Chem. Commun., Cambridge,* 18:2559-2561.
- Shin M.K., Kang M.L., Cha S.B., Lee W.J., Sung J.H. & Yoo H.S. 2011. An immunosorbent assay based on the recombinant ApxIa, ApxIIa, and ApxIIb toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(4):736-742.
- Souza K.K., Klein C.S., Kich J.D., Coldebella A. & Alberton G.C. 2008. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseada no gene cpx para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos natural e experimentalmente infectados. *Ciência Rural* 38:1954-1960.
- Townsend K.M., Boyce J.D., Chung J.Y., Frost A.J. & Adler B. 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39(3):924-929.
- Tremblay Y.D., Levesque C., Segers R.P. & Jacques M. 2013. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Vet. Res.* 9(213):1-7.
- Xiao G., Cao S., Duan L., Wen X., Ma X. & Chen H. 2006. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by Multiplex PCR based on the genes ApxIVA and OmlA. *Agr. Sci. China* 5(2):146-154.
- Xie F., Zhang Y., Li G., Zhou L., Liu S. & Wang C. 2013. The ClpP protease is required for the stress tolerance and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *PLoS One* 8(1):e53600.