



Universidade de
Aveiro
2021

**Daniela Patrícia
Crespo Duarte**

**Pesquisa e quantificação de vírus e bactérias por
PCR em tempo real**

**Screen and quantification of viruses and bacteria by
real-time PCR**



**Universidade de
Aveiro**

2021

**Daniela Patrícia
Crespo Duarte**

**Pesquisa e quantificação de vírus e bactérias por
PCR em tempo real**

**Screen and quantification of viruses and bacteria by
real-time PCR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Mestre Sandra Patrícia Santos Mondego, técnica superior do Laboratório Tomaz S. A. e da Doutora Marta Cristina Oliveira Martins Tacão, Investigadora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Luísa Seuanes Serafim

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Marta Cristina Oliveira Martins Tação

investigadora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira

professora auxiliar convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Laboratório Tomaz e à Engenheira Laura Silva por me acolherem e fazerem sentir em casa, em especial ao departamento de microbiologia pelos ensinamentos, amizade e companheirismo que me proporcionaram.

Agradeço também às minhas orientadoras, à Mestre Sandra Mondego e à Doutora Marta Tação pela disponibilidade e ajuda na escrita desta dissertação.

Queria também agradecer a todos os meus amigos de Aveiro que me ajudaram e apoiaram durante os meus anos de estudo nessa cidade e às minhas amigas do secundário por estarem sempre presentes.

Por último, agradeço aos meus pais por todo o amor e incentivo que me deram.

palavras-chave

qPCR, PRRSV, PCV2, *Leptospira*, *Mycoplasma*, *E. coli*, diagnóstico

resumo

Com o aumento da população mundial existe cada vez mais uma procura por alimentos mais seguros microbiologicamente, com melhor qualidade e com um menor tempo de produção. Nesse âmbito a produção intensiva de gado tornou-se uma indústria em crescimento para suprimir esta lacuna. No entanto, por vezes, os microrganismos patogênicos infetam estas produções e condicionam a saúde do animal e o seu uso posterior como alimento. Neste aspeto o diagnóstico rápido de modo a identificar o agente patogénico que infeta o animal torna-se essencial para o seu tratamento. Assim, o objetivo desta dissertação foi a pesquisa e o diagnóstico de microrganismos patogénicos em amostras de animais (suínos e aves) de gado intensivo pelo método de PCR em tempo real. As análises foram realizadas no Laboratório Tomaz, Leiria, que presta entre outros serviços análises veterinárias. Deste modo, foram analisadas amostras de órgãos/tecidos de suínos para o despiste de *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV), de *Leptospira* spp. e de *Porcine Circovirus Type 2* (PCV2), amostras de soros de suínos para despiste de PRRSV e PCV2, fezes de suínos para pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* e amostras de fluidos orais de aves para pesquisa de *Leptospira* spp. e de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. Aquando da sua receção as amostras de órgãos/tecidos foram armazenadas a -20°C e analisadas entre 48-72h após a colheita enquanto as amostras de soros, fluidos orais e fezes foram armazenadas a 4°C e analisadas entre 24-72h após a colheita. Para a análise do PRRSV, extraiu-se o RNA das amostras enquanto que para a análise de PCV2, *Leptospira*, fatores de virulência da *E. coli* e de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foi extraído o DNA. Para a deteção destes patogénicos, kits específicos foram usados segundo as instruções do fabricante e os alvos de deteção pelo método de qPCR foram: a ORF7 para o PRRSV, a ORF2 para o PCV2, o gene *lipL32* para a *Leptospira* patogénica e os genes *mgc2* e *vlhA* para a deteção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, respetivamente. Para a pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* os genes associados às adesinas fimbriais F4 e F18 foram os pesquisados. Após a pesquisa, foi detetado a presença de PRRSV e PCV2 em amostras de soro, a presença de ambas as adesinas fimbriais F4 e F18 em amostras de fezes e a presença de *M. gallisepticum* e/ou *M. synoviae* em amostras de fluidos orais. Assim, verificou-se que as amostras de soro eram adequadas para detetar o PRRSV e o PCV2, que as amostras de órgãos/tecidos e de fluidos orais não eram as mais indicadas para detetar a *Leptospira*. As amostras de fluidos orais eram apropriadas para detetar o *M. gallisepticum* e *M. synoviae* e amostras de fezes mostrara-se eficazes para a deteção das adesinas F4 e F18.

keywords

qPCR, PRRSV, PCV2, *Leptospira* *Mycoplasma*, *E. coli*, diagnosis

abstract

With the increase of the world population, there is a growing demand for microbiologically safer foods with better quality and shorter production time. Consequently, intensive livestock production has become a major growth industry to fulfill this gap. However, pathogenic microorganisms sometimes infect these productions and jeopardize animal health and its subsequent use as food. In this aspect, the rapid diagnosis to identify the pathogenic agent that infects the animal becomes essential for its treatment. Thus, the aim of this dissertation was the screening and diagnosis of pathogenic microorganisms in animal samples (swine and poultry) from intensive livestock using a real time PCR based method. The analyses were carried out at Tomaz Laboratory (Leiria) that provides, among other services, veterinary analysis. Thus, swine organ/tissue samples were screened for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), *Leptospira* spp. and Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), swine serum samples for PRRSV and PCV2 screening, swine feces for *E. coli* virulence factors and poultry oral fluids samples for the presence of pathogenic *Leptospira*, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Upon arrival the organ/tissue samples were stored at -20°C and analyzed within 48-72h after collection, while serum, oral fluid and feces samples were stored at 4°C and analyzed within 24-72 after collection. For the analysis of PRRSV RNA was extracted from the samples, while for the analysis of PCV2, *Leptospira*, virulence factors of *E. coli* and *M. gallisepticum* and *M. synoviae* the DNA was extracted. For the detection of these factors, specific kits were used according to the manufacturer's instructions and the detection target by the qPCR method were: ORF7 for PRRSV, ORF2 for PCV2, *lipL32* gene for pathogenic *Leptospira* and *mgc2* and *vihA* genes for detection of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* respectively. For the detection of *E. coli* virulence factors, genes associated with F4 and F18 fimbriae adhesins were investigated. After the screening it was detected the presence of PRRSV and PCV2 in serum samples, of the adhesins F4 and F18 in the feces samples and of *M. gallisepticum* and/or *M. synoviae* in the oral fluid samples. Thus, it was found that serum samples were adequate for the detection of PRRSV and PCV2, organ/tissue and oral fluid samples were not the most suitable for the detection of *Leptospira*. Oral fluid samples were appropriate to detect *M. gallisepticum* and *M. synoviae* and feces samples were effective for the detection of F4 and F18 adhesins.

Índice

Índice.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas	v
Lista de abreviaturas	vi
I. Enquadramento teórico	1
1.1 Local de estágio.....	1
1.2 Breve contextualização	2
II. Introdução	3
2.1 Indústria Suína em Portugal	3
2.2 Indústria aviária em Portugal	3
2.3 Agentes infecciosos que afetam a produção intensiva de suínos.....	4
2.3.1 Vírus do síndrome reprodutivo e respiratório suíno	4
2.3.2 Circovírus	7
2.3.3 <i>Leptospira</i>	11
2.3.4 <i>Escherichia coli</i>	14
2.4 Agentes patogénicos que afetam produções aviárias intensivas	18
2.4.1 <i>Mycoplasma</i>	18
2.5 Técnica de PCR para o diagnóstico de doenças em produções intensivas	20
2.6 Objetivos do estágio	23
III. Materiais e Métodos.....	24
3.1 Amostras	24
3.2 Extração de DNA/RNA	24
3.2.1 Isolamento e concentração de DNA/RNA	25
3.2.1.1 Amostras de órgãos/tecidos	25
3.2.1.2 Amostras em zanganoas	25
3.2.1.3 Amostras de fezes.....	26
3.2.1.4 Amostras de soro.....	26
3.2.2 Purificação do DNA/RNA	27
3.3 Amplificação do DNA/RNA por qPCR.....	27
3.3.1 Pesquisa de PRRSV	27
3.3.2 Pesquisa de PCV2	28
3.3.3 Detecção da <i>Leptospira</i> spp.	29
3.3.4 Pesquisa de fatores de virulência de <i>E.coli</i>	30

3.3.5 Detecção de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i>	31
IV. Resultados e Discussão	33
4.1 Detecção de PRRSV em amostras de órgãos/tecidos e soros de suínos	33
4.2 Detecção de PCV2 em amostras de órgãos/tecidos e soros de suínos	37
4.3 Pesquisa de <i>Leptospira</i> spp. patogênicas em amostras de órgãos/tecidos e zaragatoas.....	44
4.4 Identificação de fatores de virulência da <i>E.coli</i> presente em amostras de fezes...	46
4.5 Identificação de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> em secreções traqueais de aves.....	49
V. Conclusões.....	53
VI. Perspetivas Futuras	53
VII. Bibliografia	54
VIII. Anexos	70

Índice de Figuras

Figura 1. Esquematização das ORFs do genoma do PRRSV	5
Figura 2. Representação do genoma de PCV2.....	8
Figura 3. a) Gráfico de amplificação com as diferentes fases resultante do método de PCR em tempo real; b) Curva padrão usada para determinar a quantidade de DNA/RNA.....	21
Figura 4. Amostra de caudas de suíno para análise de PRRSV por PCR.....	23
Figura 5. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de órgãos/tecidos e respectivos valores de C_T para a detecção do PRRSV.....	33
Figura 6. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respectivos valores de C_T para a detecção do PRRSV.....	34
Figura 7. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de órgãos/tecidos e respectivos valores de C_T para a detecção do PCV2.....	37
Figura 8. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respectivos valores de C_T para a detecção do PCV2.....	38
Figura 9. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respectivos valores de C_T para a detecção do PCV2.....	39
Figura 10. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real dos padrões e respectivos valores de C_T	39
Figura 11. Gráfico do C_T em função do logaritmo da concentração de DNA e respetiva equação da reta.....	40
Figura 12. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respectivos valores de C_T para a detecção do PCV2.....	40
Figura 13. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras de órgãos/tecidos e respectivos valores de C_T para a detecção de <i>Leptospira</i>	44
Figura 14. Curva de fusão por PCR em tempo real de uma amostra de fezes para a detecção do alvo F4.....	46
Figura 15. Curva de fusão por PCR em tempo real de uma amostra de fezes para a detecção do alvo F18.....	46
Figura 16. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real de uma amostra de zangaratoas da traqueia (<i>pool</i>) e respetivo valor de C_T para a detecção de <i>Mycoplasma</i> .. Amostra negativa para a detecção do MG e MS.....	49

Figura 17. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras zaragatoas de traqueias (<i>pools</i>) e respetivos valores de C_T para a deteção de <i>Mycoplasma</i> . Amostra positiva para a deteção do MG.....	50
Figura 18. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras zaragatoas de traqueias (<i>pools</i>) e respetivos valores de C_T para a deteção de <i>Mycoplasma</i> . Amostras positivas para a deteção do MS.....	50
Figura 19. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real de uma amostra de zaragatoa de traqueia (<i>pool</i> de 10) e respetivo valor de C_T para a deteção de <i>Mycoplasma</i> . Amostra positiva para a deteção do MG e MS.....	51

Índice de Tabelas

Tabela 1. Consumo anual humano de carne <i>per capita</i> (kg/hab.) por tipos de carne.....	3
Tabela 2. Concentração de DNA de PCV2 presente nas amostras de soros.....	41
Tabela A1. Princípios a obter da amplificação do PRRS para interpretar o resultado como válido.....	67
Tabela A2. Princípios a obter da amplificação do PCV2 para interpretar o resultado como válido.....	67
Tabela A3. Princípios a obter da amplificação da <i>Leptospira</i> para interpretar o resultado como válido ou não válido.....	68
Tabela A4. Princípios a obter da amplificação de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> para interpretar o resultado como válido.....	68

Lista de abreviaturas

cDNA	DNA complementar (do inglês <i>complementary DNA</i>)
CRD	Doenças respiratórias crônicas (do inglês <i>chronic respiratory diseases</i>)
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente (do inglês <i>diffusely adherent E. coli</i>)
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa (do inglês <i>Enteroaggregative E. coli</i>)
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (do inglês <i>Enterohemorrhagic E. coli</i>)
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (do inglês <i>Enteroinvasive E. coli</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-linked Immonosorbent Assay</i>)
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica (do inglês <i>enteropathogenic E. coli</i>)
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (do inglês <i>Enterotoxigenic E. coli</i>)
HI	Teste de inibição da hemaglutinação (do inglês <i>hemagglutination inhibition</i>)
IFAs	Ensaio de Imonofluorescência (do inglês)
IHC	Técnica Imuno-histoquímica (do inglês <i>Immunohistochemical</i>)
IIF	Ensaio de imunofluorescência indireta (do inglês <i>indirect immunofluorescence assay</i>)
INE	Instituto nacional de estatística
IPMA	Ensaio de monocamada de imunoperoxidase (do inglês <i>immunoperoxidase monolayer assay</i>)
MAT	Teste de aglutinação microscópica (do inglês <i>microscopic agglutination test</i>)
MLV	vacina atenuada modificada (do inglês <i>modified live-attenuated vaccine</i>)
ORF	<i>Open reading frames</i>
PAMs	Macrófagos alveolares porcinos (do inglês <i>porcine alveolar macrophages</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	Circovírus porcino (do inglês <i>porcine circovirus</i>)
PCV1	Circovírus porcino tipo 1 (do inglês <i>porcine circovirus type 1</i>)
PCV2	Circovírus suíno tipo 2 (do inglês <i>porcine circovirus type 2</i>)
PCVAD	Doença associada ao circovírus porcino (do inglês <i>porcine circovirus-associated disease</i>)
PCVD	Doença do circovírus porcino (do inglês <i>porcine circovirus disease</i>)

PRRS	Síndrome Reprodutivo e Respiratório Suíno (do inglês <i>Porcine Reproductive and Respiratory syndrome</i>)
PMWS	Síndrome de perda mutissistêmica pós-desmame (do inglês <i>post-weaning multisystemic wasting syndrome</i>)
PRDC	Sistema complexo de doença respiratória suína (do inglês <i>porcine respiratory disease complex</i>)
PRRSV	Vírus do síndrome reprodutivo e respiratório dos suínos (do inglês, <i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>)
PWD	Diarreia pós-desmame (do inglês <i>post-weaning diarrhea</i>)
qPCR	PCR quantitativo (do inglês <i>quantitative PCR</i>)
RDT's	Testes de diagnóstico rápido (do inglês <i>rapid diagnostic tests</i>)
Rep	Proteína não estruturais associadas à replicação (do inglês <i>nonstructural replicase associated</i>)
RPA	Testes rápidos de aglutinação (do inglês <i>rapid plate agglutination</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação de cadeia da polimerase (do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
STEC	<i>E. coli</i> produtora da toxina <i>Shiga</i> (do inglês <i>Shiga Toxin E. coli</i>)
VAGs	Genes específicos associados à virulência (do inglês <i>virulence-associated genes</i>)
WGS	sequenciação do genoma completo (do inglês <i>whole genome sequence</i>)

I. Enquadramento teórico

1.1 Local de estágio

O Laboratório Tomaz é um laboratório que presta serviços de análises físico-químicas, microbiológicas e veterinárias situado em Leiria. Com mais de 35 anos de experiência, este pertence ao grupo Beatriz Godinho Saúde, um grupo que conta com muitas empresas associadas em diversas áreas, que vão desde análises clínicas até à fisioterapia, entre outras. Este laboratório é atualmente acreditado pelo instituto português de acreditação em mais de 100 parâmetros.

O laboratório tem como visão acompanhar, controlar e melhorar as condições de vida das populações, servindo da melhor maneira possível os seus clientes numa integração conjunta com os problemas ambientais atuais e de saúde pública humana. Assim, a sua missão é fornecer um serviço de excelência aos seus clientes que pretendam obter informações e soluções apoiadas em ensaios clínicos. O Laboratório Tomaz analisa diversos tipos de amostras com recurso às tecnologias mais adequadas e ao conhecimento fidedigno, interpretando os resultados obtidos de forma objetiva numa solução alinhada com os requisitos do cliente. Tudo isto, em simultâneo, com uma ideologia de uma população mais saudável e um meio ambiente mais sustentável.

Neste contexto, o tema desta dissertação: “Pesquisa e quantificação de vírus e bactérias por PCR em tempo real” alinha-se com a visão e missão deste laboratório, visto que este se irá focar na área da veterinária, mais especificamente no diagnóstico de doenças comumente associadas à produção animal intensiva. Efetivamente nestas produções o surgimento de doenças nos animais pode condicionar toda a produção e levar a perdas económicas para a indústria. Para além disso, se a doença não for diagnosticada atempadamente, a segurança alimentar e por consequência a saúde pública humana pode ser condicionada.

1.2 Breve contextualização

A medicina veterinária é a ciência médica que se compete a diagnosticar, tratar e prevenir as doenças em animais e a prevenir a transmissão das doenças dos animais para o ser humano [1]. Assim, pode-se deferir que os médicos veterinários têm também um papel importante na segurança e qualidade alimentar pois garantem a saúde dos animais para consumo humano e observam as indústrias de processamento alimentar. Devido ao aumento exponencial da população mundial e conseqüentemente na produção alimentar, a vigilância no setor alimentar tem grande relevância económica [2].

Com efeito, há uma maior procura por produtos alimentares com melhor qualidade e com menor tempo de produção [3]. Assim, a medicina veterinária é essencial para a economia da indústria animal [1] incluindo para a indústria suína e aviária, alvo desta dissertação.

Apesar de os médicos veterinários serem responsáveis por tratar os animais quando doentes, o objetivo principal das indústrias não passa pelo tratamento, mas sim pela prevenção das doenças. Para isso, fez-se uso de medicamentos (agentes antimicrobianos ou hormonas) na alimentação/ração animal e da vacinação [4]. No entanto desde 2006, os antibióticos foram proibidos pelo Comité da União Europeia (Regulamento (CE) nº 1831/2003). Deste modo as hormonas são adicionadas na água e/ou na ração a um nível subterapêutico – nível em que um aditivo alimentar encontra-se numa concentração inferior a 200 g de droga por tonelada de ração – de modo a melhorar a eficiência alimentar durante o crescimento animal e o manter o mais saudável possível [4]. Outro método preventivo normalmente usado é a vacinação, onde existe a administração do vírus ou da bactéria responsável por causar determinada doença no animal. Esses patogénicos são injetados no animal ou na forma inativada ou na forma ativada, mas em concentrações não suscetíveis de colocar o animal em sério risco de saúde (vacinas atenuadas) [5]. Deste modo, a vacinação faz uso do próprio sistema imunológico do animal, especificamente dos anticorpos, para combater a doença caso haja uma infeção externa pelo patogénico, criando assim uma resistência total ou parcial, consoante a virulência da estirpe e o sistema imunitário do animal [5].

No entanto, estes métodos preventivos muitas vezes não são suficientemente eficazes e o animal acaba por adoecer. Nesse aspeto, o diagnóstico torna-se essencial para identificar qual a doença e como tratá-la. Deste modo, doenças associadas a produções intensivas irão ser diagnosticadas nesta dissertação pelo método de PCR em tempo real.

II. Introdução

2.1 Indústria Suína em Portugal

Segundo dados do INE (Instituto Nacional de Estatística, https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000211&contexto=bd&selTab=tab2 acessado a 24 de Outubro de 2021) entre os anos de 2015 a 2018, a carne mais consumida em Portugal *per capita* foi a carne suína (com uma média de 44,2 kg/hab) e a carne de animais de capoeira, a segunda mais consumida (Tabela 1). Em 2019, o consumo de carne suína anual *per capita* foi semelhante ao valor médio entre 2015 a 2018 (44,3 kg/hab), ocupando o segundo lugar das carnes mais consumidas, mas em 2020 verificou-se uma ligeira diminuição (41,4 kg/hab). Já a carne de animais de capoeira atingiu o primeiro lugar em 2019 (44,4 kg/hab), que se manteve em 2020. Deste modo, através destes dados afere-se a importância das indústrias de suinicultura na economia de Portugal.

Tabela 1. Consumo anual humano de carne *per capita* (kg/hab.) por tipos de carne [6].

Tipo de carnes	Consumo anual humano de carne <i>per capita</i> (kg/hab.)					
	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Total de carnes e miudezas	111,2	113	113,9	117,8	119,1	115,0
Carne de suínos	44,8	43,9	43,4	44,7	44,3	41,4
Carne de animais de capoeira	39,1	41,2	42,1	43	44,4	44,3

Segundo dados do *site* Empresite, a região centro (onde se engloba Leiria, Coimbra, Santarém, Viseu, Guarda e Castelo Branco) é a zona com mais empresas de suinicultura, com 197 empresas num número total de 334 (<https://empresite.jornaldenegocios.pt/Sector/A01460/>, acessado a 15 de Janeiro de 2021).

2.2 Indústria aviária em Portugal

Analisando a Tabela 1 do capítulo 2.1 verificou-se que em 2019 e 2020 as carnes de capoeira foram das mais consumidas *per capita* ($\bar{x} = 44,4$ kg/hab) e em anos anteriores foram a segunda carne mais consumida a seguir à carne de suínos [6]. Como tal, o seu consumo *per capita* tem vindo a aumentar desde 2015 e é uma das indústrias em crescimento.

Segundo uma notícia de 11 de Abril de 2020 no agronegócio (<http://www.agronegocios.eu/noticias/o-mercado-de-carne-de-aves/>, acessado a 15 de Janeiro de 2021), a produção em Portugal de carne de aves tem vindo a aumentar

acompanhando a tendência da União Europeia (UE). Apesar de os preços praticados em Portugal serem abaixo da média da UE (165€/100 kg para a carcaça de frango) e as exportações terem diminuído em comparação com 2018, este ainda é um setor importante e com potencial para crescer, com grandes empresas como a Lusiaves a continuarem a apostar fortemente na sua produção e a expandirem o seu negócio em diferentes locais como refere uma notícia de 30 de Abril de 2020 do Jornal de Leiria (<https://www.jornaldeleiria.pt/noticia/lusiaves-vai-instalar-unidade-de-transformacao-em-pombal> acedido a 15 de Janeiro de 2021).

Assim, tal como na suinicultura, observa-se uma elevada produção de carnes aviárias na região centro de Portugal. Para além disso, afere-se a importância desta indústria para o setor económico de Portugal e como as doenças e/ou mortes dos animais desta indústria podem levar a elevados prejuízos monetários.

2.3 Agentes infecciosos que afetam a produção intensiva de suínos

2.3.1 Vírus do síndrome reprodutivo e respiratório suíno

O vírus do síndrome reprodutivo e respiratório suíno (PRRSV, do inglês *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*), identificado em 1987 nos Estados Unidos da América (EUA) [7] e em 1990 na Europa [8], é responsável por uma das doenças suínas, a doença do síndrome reprodutivo e respiratório suíno (PRRS, do inglês *porcine reproductive and respiratory syndrome*), que mais prejuízo económico tem dado mundialmente [9]. Alguns estudos efetuados entre 2005 a 2010 em produções intensivas de suínos nos EUA, referem prejuízos anuais devido à perda da produtividade da criação e crescimento dos suínos (sem contabilizar os custos extra associados à saúde do animal e biossegurança) de aproximadamente 664 milhões de dólares [9].

O PRRSV é um vírus de RNA positivo de cadeia simples, encapsulado e que pertence à ordem *Nidovirales*, família *Arteriviridae* [10]. O seu genoma, contém, 10 ORFs (do inglês, *open reading frames*) designadas como ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 e ORF7 e tem aproximadamente 15 kb de comprimento (Figura 1) [11]–[13]. Enquanto as ORF1a e ORF1b são as maiores ORFs do genoma viral, constituindo cerca de três quartos do mesmo, e codificam para proteínas não estruturais (Nsp, do inglês *non-structural proteins*), as restantes ORFs (2-7) codificam as proteínas estruturais [14].

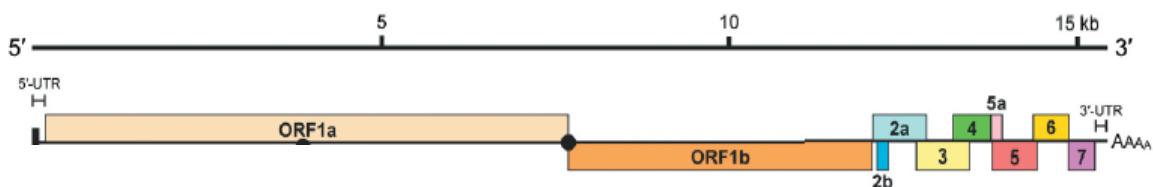


Figura 1. Esquemática das ORFs do genoma do PRRSV. Adaptado de [14].

Este vírus divide-se, devido às suas diferenças genéticas, antigênicas e patogênicas, em dois genótipos, o genótipo europeu (EU, do inglês *European*) e o genótipo norte-americano (NA, do inglês *North-American*) [15]. Por ser um vírus com muitas variantes (heterógeno), a sua eliminação definitiva na natureza é pouco provável [15]. Os únicos hospedeiros naturais identificados para este vírus são os suínos [16].

A infecção pelo vírus PRRSV divide-se em três partes que consistem, nomeadamente, na infecção aguda, na persistência e por último na extinção. Na primeira fase (aguda) o vírus é detetado 12h após o contágio no hospedeiro, com os pulmões a apresentarem lesões após 3 dias [17]. Propõe-se que o vírus se replique no trato respiratório superior maioritariamente em macrófagos alveolares porcinos (PAMs, do inglês *porcine alveolar macrophages*), de onde se dissemina, primeiramente para os nódulos linfáticos e de seguida para outros órgãos do animal (e.g sistema reprodutor) [17]. Nesta fase, o vírus é detetado tanto nos órgãos linfóides como nos órgãos não linfóides [18].

No segunda estágio (persistência), a replicação do vírus diminui deixando de ser detetado nos pulmões e em órgãos não linfóides e passa a ocorrer maioritariamente nos órgãos linfóides (amígdala e nódulos linfáticos) [18]. O animal continua no entanto a ser seropositivo e uma transmissão do vírus entre porcos pode ocorrer através de secreções nasais e orais e de atividade sexual [18], [19]. Na última etapa (extinção), o animal fica seronegativo e o vírus deixa de se replicar e extingue-se, antes desta fase os últimos locais a evidenciarem vestígios de replicação viral são os órgãos linfóides [18]. Apesar de não se saber a duração da infecção até à extinção do vírus, a literatura [20] remete que a replicação pode ser mantida até 251 dias após a infecção, o que tendo em conta o período que passa entre o nascimento de um leitão até ao seu abate para consumo, poderá corresponder a grande parte ou totalidade do tempo de vida do animal.

Inicialmente designada como a doença da orelha-azul [21], os principais sinais clínicos associados a esta doença nos suínos são: problemas respiratórios que variam de leves a graves e falhas no sistema reprodutor de porcas grávidas [16].

Este vírus pode agravar a situação clínica do animal e originar doenças mais graves quando atua como um agente primário na infecção respiratória ou quando é um dos cofactores num sistema complexo de doenças respiratórias suínas (PRDC, do inglês *porcine respiratory disease complex*) [16]. Infecções simultâneas de PRRSV com outros patogénicos como *Mycoplasma hyopneumoniae* [22] ou o circovírus porcino (PCV, do inglês *porcine circovirus*) [23] podem ocorrer e induzir sintomas clínicos e lesões pulmonares mais graves em comparação com infecções isoladas destes agentes patogénicos [24].

Focando apenas nos problemas reprodutores que este patogénico pode originar, estes variam de leves a muito graves e podem levar à morte embrionária ou nascimento de animais com infecções congénitas [25]. Durante a gestação quando mais cedo um feto for infetado pelo PRRSV maior é a probabilidade de ele não sobreviver [18].

Já foram reportados na literatura vários tipos de amostras a serem analisadas durante a fase de diagnóstico, nomeadamente, sangue (soro) [26], secreções nasais [27] e órgãos/tecidos [28]. Num estudo conduzido por Plut *et al.* 2020 [29] foram analisadas amostras de fluidos orais (OF, do inglês *oral fluids*), fezes e soro pelo método de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) e compararam-se os resultados de forma a determinar qual a melhor matriz para deteção do vírus PRRSV. As amostras de OF mostraram-se mais eficazes para detetar a presença do vírus em comparação com amostras de fezes, devido provavelmente à presença de menor quantidade de substâncias inibidoras. Comparando as amostras de OF com as amostras de soro estas demonstraram ser concordantes entre si, exceto em amostras de porcos de engorda. Neste caso, apesar de a infecção ser detetada em ambos os tipos de amostras durante o período de amamentação até às onze semanas, no período de desmame/transferência do leitão e no período de engorda, os anticorpos eliminaram a presença deste vírus no sangue (soro) levando a que este fosse apenas diagnosticado na amostra de OF. Assim, conclui-se que este estudo corrobora o mencionado anteriormente, que são os órgãos linfóides os últimos a evidenciar a replicação viral e que, portanto, as amostras de fluidos orais são uma matriz eficaz [29].

Noutro estudo conduzido por Pepin *et al.* 2015 [27], analisaram diferentes tipos de amostras por RT-PCR e por ELISA, num período entre 0-14 dias após a vacinação com uma vacina atenuada modificada contra o PRRSV. Neste as amostras analisadas foram soro, amostras sanguíneas, fluidos orais, sémen (sobrenadante e fração celular) e amostras de “saliva espumosa”, saliva esta que aparece nos porcos aquando da época de acasalamento.

Comparando ambos os testes entre si [27], observa-se que o teste de ELISA não é tão eficaz na deteção da doença numa fase inicial da infeção, detetando o vírus passado 9 dias enquanto que a técnica de PCR detetou-o passado 1 dia. Para além desta vantagem da técnica de PCR em comparação com a técnica de ELISA, também se verificou que no caso da técnica de ELISA apenas o soro e o fluido corporal demonstraram ser mais fidedignos na deteção dos anticorpos contra o PRRSV, enquanto na PCR apesar de o soro e os fluidos corporais serem também os mais fiáveis, também o sémen e as zaragatoas esfregadas em amostras sanguíneas demonstraram ser eficazes para detetar este patogénico. Neste estudo [27] também se verificou que o sémen foi o tipo de amostra menos específica para a deteção do vírus por PCR e como tal não é a melhor matriz para detetar o mais antecipadamente possível o PRRSV. Para além disso, a saliva espumosa não demonstrou ser uma amostra eficaz devido à dificuldade da sua colheita, havendo dias em que a quantidade produzida era insuficiente para ser utilizada no método de PCR.

2.3.2 Circovírus

O circovírus é um vírus de cadeia simples, circular e sem envelope celular [30] que pertence à família *Circoviridae*, género *Circovirus* [31]. Este tem uma gama de hospedeiros muito restrita, sendo detetado principalmente em aves e porcos [31] e com menor incidência em cães [32]. Nos suínos o vírus foi primeiramente descoberto em cultura celular em 1974 [33]. Após se compreender que não estava relacionado nem com o parvovírus nem com o picornavírus, denominou-se de circovírus porcino (PCV, do inglês *porcine circovirus*) por apresentar um genoma circular [34].

Inicialmente reconhecido como não patogénico em 1982 [34], em 1998 foram descobertas variantes patogénicas [35], passando a designar-se dois grupos distintos: (i) o PCV1 derivado das células Pk-15 e inofensivo [36]; (ii) o PCV2, patogénico e que inclui as variantes PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d e PCV2e [37].

Apresentam-se como partículas virais de forma icosaédrica com aproximadamente 15-20 nm de tamanho [31]. Ambas as variantes do vírus são caracterizadas por apresentarem o seu genoma em cadeia simples de DNA com duas principais ORFs [38], uma que codifica para uma proteína do capsídeo (C) e outra que codifica para uma proteína não estrutural associada à replicação (Rep, do inglês *nonstructural replicase associated*) – Figura 2 [30]. Estudos onde se analisaram as sequências de nucleótidos do PCV1 e do PCV2 demonstraram que estes compartilham aproximadamente 68% de identidade [39] e que os anticorpos monoclonais criados contra o PCV1 falham em reconhecer o PCV2 [40], ou seja, que um suíno recuperado da infecção com PCV1 não ganha maior imunidade contra uma possível infecção por PCV2. O foco desta dissertação será o PCV2 por ser a variante patogénica responsável pela doença no animal e, em casos mais graves, a sua morte.

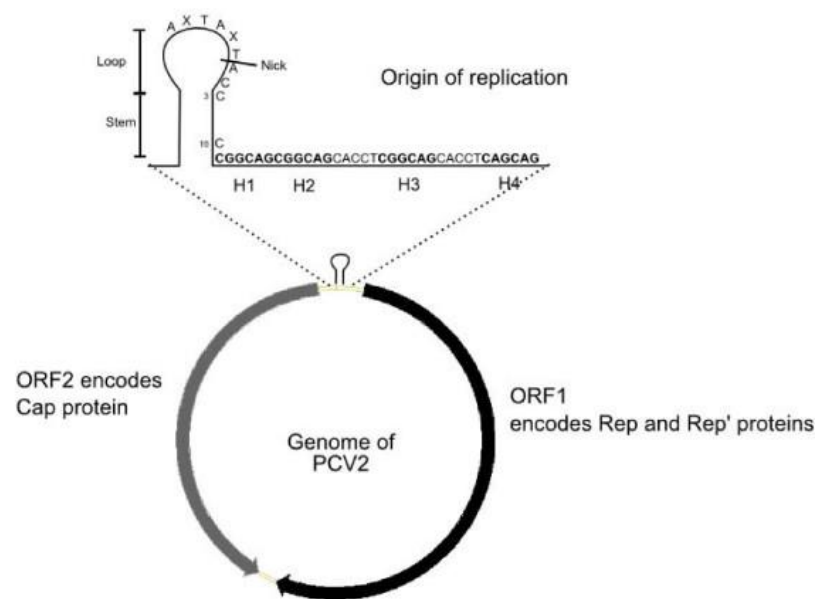


Figura 2. Representação do genoma de PCV2. Retirado de [41].

O PCV2 é o vírus mais pequeno atualmente conhecido que infeta mamíferos [42] com aproximadamente 1,7 – 2,3 kb de tamanho e cuja replicação depende em larga escala do hospedeiro [31]. Acredita-se que a sua patogenicidade aos hospedeiros esteja relacionada com o seu efeito imunossupressor [43]. Este é um vírus ubíquo com mais de 50% dos porcos selvagens mundialmente a encontrarem-se infetados [42], [44]. O seu contágio efetua-se pelas fezes, urina, transmissão direta e transmissão transplacentária (colostro e/ou vias de fluidos seminais) [42].

Como, aquando da sua descoberta apenas se associou este vírus a doenças nos leitões após o desmame denominou-se inicialmente as doenças provocadas por este vírus como uma síndrome de perda mutissistémica pós-desmame (PMWS, do inglês *postweaning multisystemic wasting syndrome*) [45]. No entanto após a identificação de outros sintomas em suínos adultos, tais como distúrbios reprodutivos, doenças entéricas e problemas respiratórios, foram definidas novas designações para o conjunto de doenças relacionadas com o PCV2: (i) doenças associadas ao circovírus porcino (PCVAD, do inglês *porcine circovirus-associated disease*) nos Estados Unidos da América e (ii) doenças do circovírus porcino (PCVD, do inglês *porcine circovirus disease*) na Europa [38]. Deste modo, PCVAD/PCVD refere-se ao conjunto das variadas doenças descobertas até ao momento pelas quais o circovírus porcino é responsável ou um dos cofatores, e inclui: o PMWS [45], o síndrome de dermatite suína e nefropatia porcino (PDNS, do inglês *porcine dermatitis and nephropathy syndrome*) [46], o complexo de doença respiratória suína (PRDC, do inglês *porcine respiratory diseases complex*) [47], as falhas reprodutivas [48] e os problemas entéricos [49].

Para se diagnosticar a PCVAD ou PCVD é necessário analisar um variado conjunto de tecidos/órgãos e que podem incluir os órgãos linfóides, os pulmões, o sistema digestivo, o sistema cardiovascular, o sistema nervoso, entre outros [50]. Neste aspeto, a visualização de lesões características simultaneamente com a utilização de métodos para detetar o vírus, como por exemplo a técnica de PCR ou a técnica Imuno-histoquímica (IHC, do inglês *Immunohistochemical*), são essenciais para se determinar se o animal desenvolveu a PCVAD, pois o PCV2 pode estar presente no animal mas ser assintomático e não levar ao seu adoecimento [32]. Assim, podemos concluir que o PCV2 é um vírus pouco restritivo que pode infetar qualquer órgão e/ou tecido do sistema do animal [50].

Efetivamente, verificou-se no estudo [51] que amostras de soros de suínos que continham o PMWS, apresentavam uma carga viral de PCV2 superior em comparação com as amostras de soro dos suínos que não apresentavam a doença, especulando-se que uma concentração mínima de PCV2 tem que estar presente no animal para este desenvolver PMWS. Deste modo a presença de PCV2 no animal não significa que este desenvolverá obrigatoriamente uma doença clínica [51].

As amostras alvo de análise para a deteção deste vírus incluem amostras de sangue (soro), de colostro [52] e de órgãos/tecidos como por exemplo amostras de pulmão, coração, timo, baço, intestino delgado [53], etc.

Efetivamente, num estudo conduzido por Segalés *et al.* 2005 [54], comparou-se por PCR em tempo real a quantificação de PCV2 em amostras de soro, e de zaragatoas de amígdalas, nasais, de secreções traqueobrônquicas, de urina e de fezes, de vários porcos com e sem PMWS. Este estudo permitiu confirmar que o genoma do PCV2 é potencialmente detetado em todo o tipo de amostras analisadas no estudo, e que é possível obter o material genético através de zaragatoas das diferentes matrizes utilizadas. Neste foram quantificadas as amostras positivas, tendo-se verificado que as zaragatoas de secreções traqueobrônquicas tiveram uma maior carga de PCV2, seguida do soro, zaragatoas de amígdalas, nasais, de fezes e, por último, de urina. Assim, concluíram que os soros e as zaragatoas de secreções nasais e orais são matrizes eficazes para a deteção deste agente patogénico e que, sempre que possível, deve-se dar preferência a estas matrizes ao invés de amostras fecais ou urinárias [54].

Os métodos de diagnóstico usados na deteção de PCV2 incluem os métodos serológicos, o PCR em tempo real e a técnica de imuno-histoquímica (IHC, do inglês *Immunohistochemical*) [36] [55]. Os métodos serológicos para a deteção deste vírus incluem o ensaio de monocamada de imunoperoxidase (IPMA, do inglês *immunoperoxidase monolayer assay*), o ensaio de imunofluorescência indireta (IIF, do inglês *indirect immunofluorescence assay*) e a técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) [36].

Comparando a técnica IHC com o PCR em tempo real verificou-se que no caso da técnica IHC esta é menos sensível, detetando o PCV2 na fase aguda de infeção mas mais exata na deteção de casos clínicos de PMWS [55]. O PCR por sua vez permite detetar o vírus PCV2 em fases iniciais do seu contágio e é menos específico que a técnica de IHC, detendo o vírus em outras zonas do organismo do animal sem ser nos órgãos a onde a doença clínica é desenvolvida [55], [53].

Para o diagnóstico de PMWS a análise histológica das lesões características torna-se essencial. Num estudo [56], comparou-se dois métodos serológicos, o método IPMA e o método de ELISA, ao mesmo tempo que se avaliou a deteção de PCV2 por PCR em tempo real e analisou-se se a conjugação de qPCR com estes métodos serológicos (IPMA ou ELISA) permite detetar casos clínicos de PMWS eficazmente. Analisando os resultados verificou-se que o teste de IPMA tem um limite de deteção mais baixo para o PCV2 em comparação com a ELISA e que o qPCR demonstrava uma maior sensibilidade e especificidade para diagnosticar PMWS quando conjugado com o IPMA. Apesar de esta conjugação poder ser usada para confirmar potencialmente casos suspeitos

de PMWS, caso esta doença esteja num estado relativamente inicial há elevada probabilidade de se obter resultados falsos negativos. Assim a conjugação de qPCR com métodos serológicos não é tão eficaz para detetar o PMWS em comparação com o uso de qPCR e a observação de lesões histopatológicas.

2.3.3 *Leptospira*

Leptospira é um género de bactérias da família *Leptospiraceae*, com características similares a bactérias gram-negativas relativamente ao invólucro celular, de forma espiral e com as células a terem um diâmetro médio de 0,1 µm e 6-20 µm de comprimento [57]. Estes microrganismos compreendem atualmente cerca de 20 espécies, das quais 13 são patogénicas que se dividem por 24 serogrupos e, cerca de, 250 serovars [58], [59]. *Leptospira* spp. inclui espécies saprófitas, patogénicas e intermédias entre estas duas, tendo estas bactérias a capacidade de infetar um amplo espectro de hospedeiros, incluindo mamíferos, de sobreviver em ambientes marinhos e crescer em ambientes aeróbicos e/ou microaerofílicos [59] [60]. Apresentam um conteúdo em G+C entre 35 - 42 mol% e tamanhos de 3,9 a 4,6 Mbp [60].

As espécies patogénicas do género *Leptospira* são as responsáveis pela *Leptospirose*, uma das doenças zoonóticas mais difundidas mundialmente [61] e responsável por cerca de 59 000 mortes humanas por ano [62]. As espécies patogénicas produzem biofilmes que ajudam na sua sobrevivência no meio ambiente, e.g no solo e em ambientes aquáticos [63] e difundem-se na natureza essencialmente pela urina e água contaminada [61]. Os rins são os órgãos dos hospedeiros onde esta bactéria se localiza; nestas situações as bactérias multiplicam-se nos tubos renais proximais e são de seguida excretadas pela urina [60]. Após serem excretadas do organismo, estas persistem no meio ambiente e invadem um novo hospedeiro, onde repetem o ciclo [60]. Quando o hospedeiro não é afetado negativamente pela presença da *Leptospira* no seu sistema, estabelece-se uma relação comensal entre os dois organismos [60].

Os principais hospedeiros de infeções de *Leptospira* spp. com significância global são: os humanos, o rato castanho, o gado bovino, as ovelhas, os porcos e os cães [62], [64]. Especificando nos suínos, a *Leptospirose* é relativamente comum e pode levar a perdas económicas significativas [63]. As espécies patogénicas que infetam suínos são *Leptospira interrogans*, a *Leptospira borgpetersenii* e a *Leptospira kirscheneri* [63]. Os

serogrupos mais comumente associados à infeção em porcos são o serogrupo *Pomona*, *Australis* e *Tarassovi* [60].

Em relação ao serogrupo *Pomona* os principais indícios clínicos observados são o nascimento de leitões debilitados, a ocorrência de abortos nas porcas e o parto de leitões mortos (partos natimortos) [65]. Estes indícios são mais visualizados nos leitões jovens, que podem desenvolver uma doença sistémica aguda fatal, do que nos suínos adultos [65]. As porcas adultas que não estejam em gestação e os porcos adultos são na maioria das vezes portadores assintomáticos deste serogrupo, contaminando, no entanto, o solo ou outro local em que urinem até cerca de um ano após infeção [60]. Após a recuperação dos abortos sofridos as porcas não apresentam, na maioria dos casos, problemas subsequentes no seu sistema reprodutor, mesmo as que estiveram infetadas por longos períodos de tempo [66].

O funcionamento e contágios dos outros serogrupo (*Australis* e *Tarsssovi*) são menos conhecidos, sendo ambos não identificados à escala global [60]. O primeiro foi identificado em apenas alguns países, onde se inclui a Holanda [67], Inglaterra [68] e os Estados Unidos da América [69], já o segundo foi identificado essencialmente em países da Europa Oriental [60].

Para a deteção desta bactéria em suínos podem ser utilizadas diferentes tipos de amostras, tais como amostras de sangue, tecidos dos animais (p.e rim, baço, etc) [63] e sémen [70]. Esta última é relevante, não só para impedir a propagação da doença, mas também pelo facto de a maioria das gestações serem realizadas através de inseminação artificial com sémen comprado para assegurar características genéticas favoráveis e diminuir o potencial de infeções [70]. Desta maneira uma deteção antecipada de possíveis problemas no sémen pode salvaguardar a saúde das porcas e diminuir perdas económicas para a empresa.

Destes tipos de amostras, poucos estudos comparam-nas entre si para determinar qual a mais eficaz para utilizar num método de diagnóstico baseado em PCR. Efetivamente, por regra geral, o sangue (soro) é o tipo de amostra mais usado para detetar *Leptospira* pelo método de teste de aglutinação microscópica (MAT, do inglês *microscopic agglutination test*), método serológico preferenciado, pois permite a distinção de espécies de *Leptospira* patogénicas de saprófitas, e a distinção do serogrupo [71]. Em relação à deteção de *Leptospira* spp. em órgãos/tecidos e em amostras de urina, o método mais utilizado é o PCR em tempo real. [72] [73]. Um dos estudos [73] analisou amostras de soro e de urina em relação à presença de *Leptospira* patogénicas, utilizando

a técnica de PCR em tempo real e tendo como alvo o gene *lipL32*. Analisando os resultados verificou-se uma maior eficácia na extração de amostras de soro (68,3%), sangue (44,7%) e de urina (30,0%).

A *Leptospirose* pode ser diagnosticada por diferentes métodos serológicos como ELISA, MAT e testes de diagnóstico rápido (RDT's, do inglês *rapid diagnostic tests*), que se baseiam essencialmente na deteção de anticorpos [64]. No entanto estas técnicas imunológicas só conseguem detetar esta bactéria na fase mais tardia da doença (após mais de 7 dias do início da infeção) [73]. Nesse aspeto a técnica de qPCR tem a vantagem de permitir uma deteção mais precoce, na fase aguda inicial [73]. Para além desses métodos, pode-se também referir o ensaio de Imonofluorescência (IFAs) [74].

Falando em relação às desvantagens dos métodos serológicos pode-se referir: a demora da análise e a necessidade de, em certos métodos, se isolar as estipes desta bactéria em meios de culturas, aumentando assim o risco de contaminação quer com outras *Leptospiras* saprófitas quer com outras bactérias de outras amostras [74]. O IFA tem como principal desvantagem o facto de, como exige o reconhecimento de superfícies expostas aos epítomos (menor porção do antigénio com potencial de gerar uma resposta imune) das proteínas por anticorpos específicos de OmpL54, esses epítomos podem não ser reconhecidos e dar origem a resultados falsos negativos [74]. Por último, apesar da técnica de PCR permitir o diagnóstico da *Leptospira* num elevado número de amostras diferentes, como sangue, soro, urina, rim, fígado, placenta e outras amostras de tecidos, a verdade é que a maioria apenas deteta a *Leptospira* patogénica do grupo I e falha em reconhecer o grupo de *Leptospira* intermédias do grupo II, que também demonstram alguma patogenicidade e que apesar de inferior às *Leptospiras* patogénicas é superior às saprófitas [74].

Numa pesquisa conduzida por Poudel *et al.* 2020 [63] em que se analisaram amostras de sangue, baço e rins verificou-se que, enquanto que com o método de PCR, 3,2% das amostras analisadas eram positivas para a presença da bactéria da *Leptospira*, o teste de ELISA demonstrava uma percentagem muito superior com 44,2% de seropositividade. A discrepância nestes dois métodos pode se dever às diferenças no estado de infeção da *Leptospira* spp. Como esta bactéria coloniza normalmente vários órgãos-alvo do hospedeiro, rapidamente deixa de se detetar na corrente sanguínea, originando infeções crónicas e assintomáticas. Para além disso, o teste de ELISA usado detetou tanto *Leptospira* patogénicas como saprófitas, enquanto o de PCR apenas detetou as bactérias patogénicas. Assim, aliando estes dois fatores, essa diferença é compreendida

e conclui-se que, apesar de o PCR ter detetado uma percentagem inferior de *Leptospira*, não é um método menos sensível. Por último, apesar de o teste de aglutinação microscópica não ter sido efetuado este demonstra alta sensibilidade, permitindo detetar anticorpos específicos do serogrupo, e é por esse motivo mais vantajoso que o método de ELISA usado neste caso e o teste principal para o serodiagnóstico da *Leptospirose* [63].

2.3.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa que se encontra comumente na microbiota intestinal dos mamíferos incluindo seres humanos, sendo um dos microrganismos mais amplamente estudados e manipulado laboratorialmente [75], [76] Estas bactérias são constituídas por um cromossoma circular com 4,6 Mb de comprimento e uma origem de replicação [77]. Este grupo de bactérias é dividido em oito grupos filogenéticos nomeadamente os grupos A, B1, B2, C, D, E, F e *clade* – I [78]. Enquanto a maioria das estirpes desta bactéria são inofensivas, algumas são virulentas e causam graves problemas de saúde para os animais e seres humanos [75].

Apesar das diferentes estirpes de *E. coli* existentes e das diferentes relações que cada uma estabelece com o hospedeiro (ou relação simbiótica ou patogénica), todas compartilham um genoma central que lhes confere determinadas características iguais [76]. Assim as diferenças entre as estirpes de *E. coli* encontra-se no genoma acessório, que inclui, na maioria das vezes, determinantes genéticos que codificam para fatores de virulência. Este dinamismo genético permite às variadas estirpes de *E. coli* patogénicas infetar diferentes hospedeiros [76], tais como os suínos. Apesar dos leitões nascerem com o trato gastrointestinal estéril, este rapidamente é colonizado por microrganismos [79], e estima-se que na fase adulta, o porco apresente 10^{10} - 10^{11} bactérias por grama de tecido intestinal [80], entre as quais se incluem *E. coli*.

Uma das doenças comuns na indústria suína em que *E. coli* é o agente patogénico é a doença denominada de diarreia pós-desmame (PWD, do inglês *post-weaning diarrhea*), assim chamado por afetar suínos nas primeiras semanas pós-desmame [81] e que pode originar elevados prejuízos económicos nesta indústria.

Como principais *E. coli* patogénicas que levam à diarreia pode-se referir a *E. coli* enteropatogénica (EPEC, do inglês *enteropathogenic E. coli*), a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, do inglês *enterohemorrhagic E. coli*), a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, do inglês *enterotoxigenic E. coli*), a *E. coli* enteroagregativa (EAEC, do inglês

enteroaggregative E. coli), a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, do inglês *enteroinvasive E. coli*), a *E. coli* difusamente aderente (DAEC, do inglês *diffusely adherent E. coli*) e a *E. coli* produtora da toxina *Shiga* (STEC) [82]. Tanto as ETEC, como as EAEC, as EIEC, as DAEC e as STEC já foram relatadas como causa provável de diarreias nos suínos [83].

O trato gastrointestinal dos leitões é condicionado pelos fatores de *stress* a que o animal é sujeito, ficando este mais vulnerável principalmente após o seu desmame [84]. O período de desmame de um leitão é um dos períodos mais stressantes para o animal por implicar a mudança do seu regime alimentar, hierarquia social e habitat. Este período compromete a função da barreira intestinal e aumenta a fragilidade do leitão para infecções gastrointestinais [84]. Uma das maneiras usadas para evitar estas infecções gastrointestinais passava pela adição de antibióticos nas rações, no entanto devido ao problema do aumento de estirpes resistentes [85] em 2006 o seu uso foi proibido na União Europeia (Regulamento (CE) nº 1831/2003) e alternativas procuradas (e.g acidificantes, prebióticos, níveis farmacológicos de zinco e cobre, extratos de plantas, entre outros) [86].

Em geral, as *E. coli* patogénicas responsáveis por levar a doenças intestinais nos seus hospedeiros expressam fatores de virulência que induzem e/ou suportam uma inflamação no intestino [87]. No entanto, apesar da correlação da patogenicidade de uma estirpe com os fatores de virulência que esta possui, esta não é uma relação exclusiva. Com efeito, podem existir *E. coli* inofensivas para o hospedeiro, que estejam numa relação comensal com este, mas que possuam alguns genes de virulência [88]. Assim, não é unicamente a presença ou ausência de fatores de virulência que determina a patogenicidade de uma estirpe, mas sim como os vários genes virulentos atuam em conjunto e com o organismo do hospedeiro [88]. Após a infeção do trato gastrointestinal dos suínos por *E. coli* patogénicas, uma competição por nutrientes verifica-se entre estas bactérias com as bactérias comensais indiscriminadamente, com as estirpes patogénicas a libertarem toxinas (bacteriocinas) com capacidade para matar estirpes de *E. coli* comensais [89].

Das diferentes *E. coli* patogénicas existentes envolvidas no PWD dos suínos mundialmente, as *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ETEC) são as principais responsáveis por esta patologia [90]. Estas expressam adesinas fimbriais que se apegam à superfície da mucosa intestinal [90], tais como a F4 (anteriormente denominada K88), a F5 (K99), a F6 (987P), a F41 e a F18 (F107, 2134P e 8813) [91], as mais comumente detetadas são a F4 e a F18 [90]. Tanto a F4 como a F18 apresentam diferentes variantes

antigénicas. A F4 apresenta três variantes (ab, ac e ad) e a F18 apresenta duas variantes (ab e ac). Para ambas estas adesinas, a variante mais prevalente é a ac [90]. Normalmente, a F4 está relacionada com a PWD no período mais inicial, enquanto que a F18 é relacionada numa fase mais tardia. Com efeito, associa-se a PWD em leitões recém-desmamados (cerca de 2-3 dias) à adesina F4 e o PWD em suínos com maior tempo de desmame (2-6 semanas) à adesina F18 [90]. O serogrupo ETEC predominante associado ao PWD clássico mundialmente é o O149-F4 [90].

Para além das adesinas fimbriais, as ETEC produzem igualmente enterotoxinas estáveis ao calor como as enterotoxinas STa, a STb e a EAST (toxina estável ao calor enteroagregativa 1) e enterotoxinas termolábeis como a LT, responsáveis pela diarreia nos porcos [90].

Outros fatores que podem ser usados para identificar e caracterizar as ETEC incluem os antigénios O, H e os antigénios de fator de colonização (CFAs, do inglês *colonization factor antigens*) [92]. Em relação à composição destes antigénios, tanto o antigénio H como os antigénios CFAs são proteínas, já o antigénio O é composto por várias unidades de monossacarídeos que se estendem da superfície da *E. coli* [92]. No estudo [92] foram contabilizados 34 serogrupos H diferentes de 730 estirpes isoladas de ETEC e 78 serogrupos O de 954 estirpes. As análises efetuadas sugerem que não existe incompatibilidade entre os diferentes serogrupos O, os serogrupos H e os CFA ou toxinas, apesar de determinadas combinações serem mais observadas/preferenciadas [92]. Atualmente 57 antigénios H (do H1 até ao H56) [93] e 187 antigénios O [94] foram identificados.

O tipo de amostras normalmente analisadas para o diagnóstico dos fatores de virulência da *E. coli* consistem, principalmente, em amostras fecais, intestinais [95] ou zaragoas esfregadas nestes locais [96]. Em suma, para o diagnóstico dos fatores da *E. coli* analisa-se, em geral, amostras provenientes do trato gastrointestinal, visto ser o habitat desta bactéria [82].

Para caracterizar a relação entre diferentes estirpes de *E. coli*, um dos métodos preferenciados é a tipagem de sequências *Multilocus* (MLST, do inglês *multilocus sequece typing*). Neste, dos vários perfis de MLST, os mais idênticos agrupam-se em tipos de sequências (ST, do inglês *sequence types*) [97].

Para identificar a estirpe de *E. coli* é relevante determinar os antigénios O e H. De modo a determinar o antigénio O vários métodos podem ser usados, incluindo métodos serológicos e moleculares [94]. Em relação aos métodos serológicos, um dos

métodos mais simples e considerado como padrão foi o método desenvolvido por Kaufmann *et al.* 1947 [98], onde se identificava o esquema antigénico usando culturas fervidas de *E. coli* para a produção de antissoros e identificava-se o antígeno O, observando se havia aglutinação entre esses antissoros e a estirpe desconhecida. Como principais desvantagens deste método pode-se referir o facto de algumas estirpes apresentarem reações cruzadas, o tempo da análise que requiere e os antissoros não se encontrarem disponíveis comercialmente e, portanto, não poderem ser padronizados [93]. Deste modo, outros métodos foram investigados e, com o avanço tecnológico, métodos moleculares foram testados e usados.

Neste contexto, têm-se utilizado os seguintes métodos moleculares: polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RELP, do inglês *restriction fragment length polymorphism*) [99], PCR em tempo real de alto rendimento [100], PCR multiplex [101], *microarray* [102], citometria de fluxo [103], NeoSEEK™ (espectrometria de massa) [104], entre outros.

Comparando o método de PCR com a serotipagem clássica, verificam-se que determinados grupos O identificados pela serotipagem, não são identificados (resultados negativos) pelo método de PCR [94]. Estas diferenças podem estar relacionadas com a presença de mutações (inserções, deleções ou trocas genéticas) no gene alvo analisado pelo PCR [94]. Deste modo mais isolados clínicos e de campo têm que ser testados para se obter resultados mais exatos para o método de PCR [94].

Assim, apesar de a serotipagem ser um método eficaz para uma abordagem inicial novos métodos moleculares mais rápidos, exatos e com uma boa relação de custo-benefício estão a ser desenvolvidos [94], como exemplo de um método molecular mais recentemente desenvolvido pode-se referir a sequenciação do genoma completo (WGS, do inglês *whole genome sequence*), havendo atualmente uma ferramenta *web* conhecida como *SerotypeFinder* que permite identificar os serotipos de *E. coli* através da análise dos dados WGS [105].

Por último, em relação à identificação de genes específicos associados à virulência (VAGs, do inglês *virulence-associated genes*) das estirpes de *E. coli*, diferentes métodos moleculares têm sido utilizados, incluindo a qPCR [106], a PCR multiplex [107] e a análise de curvas de *melting* de alta resolução (análise de HRM, do inglês *high resolution melting analysis*) após amplificação por PCR em tempo real (HRM-qPCR) [108]. Uma das metodologias rápidas e práticas para detetar os VAGs é o método *microarray* [109]. No estudo [109], os VAGs foram amplificados por PCR e imobilizados em lâminas de

vidro para criar um *chip microarray*, que permitiu a sua identificação num único ensaio. Em comparação com os métodos de PCR esta técnica permite identificar uma maior quantidade de genes associados à virulência num menor espaço de tempo e é uma boa abordagem inicial para identificar o patótipo da estirpe e o surgimento de novos patótipos [109]. Quando se pretende pesquisar um fator de virulência em específico (por exemplo o F4) o PCR em tempo real é um método ideal. Nesses casos o PCR torna-se vantajoso, comparativamente com o *microarray*, uma vez que é mais rentável monetariamente e laboralmente mais sensível e específico [88]. Uma das principais desvantagens do método de PCR é o facto de não permitir a deteção de mutações pontuais subtis ao contrário de por exemplo o método MLSP [88].

2.4 Agentes patogénicos que afetam produções aviárias intensivas

2.4.1 *Mycoplasma*

As bactérias do género *Mycoplasma* são um grupo de bactérias de dimensões reduzidas entre 0,2-0,3 µm [110] que pertencem à classe *Mollicutes* [111]. Estas têm como principais características o facto de serem organismos parasitas ou comensais, de terem genomas de tamanho reduzido entre 580 a 1350 kb, de não terem parede celular e de se proliferarem e hospedarem no trato respiratório e urogenital dos hospedeiros (humanos, plantas, insetos e animais) [111] [112]. Neste género de bactérias 120 espécies estão incluídas e 20 associadas a infeções em aves [113].

De entre os microrganismos patogénicos pertencentes ao género *Mycoplasma*, destacam-se dois mais problemáticos e que levam a elevados prejuízos económicos para a indústria aviária, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS), que infetam exclusivamente aves [114]. A infeção com *Mycoplasma gallisepticum* pode originar doenças respiratórias e reprodutivas graves no animal e, conseqüentemente, provocar elevados prejuízos económicos para a indústria [114]. Esta patologia provoca o retardo no crescimento das aves, aumenta a mortalidade embrionária (por condicionar a eclosão dos ovos) e reduz a produção de ovos [115]. Os sintomas clínicos de uma infeção por MG são inespecíficos e incluem tosse, agonia respiratória, secreções nasais e conjuntivite [114]. Estes sintomas podem evoluir e levar a doenças respiratórias crónicas (CRD, do inglês *chronic respiratory diseases*) no animal [116]. Os hospedeiros mais comuns que são infetados por esta bactéria incluem os perus e as galinhas [116].

Tal como a infeção pelo MG, também a infeção com *Mycoplasma synoviae*, pode causar doenças respiratórias crónicas de intensidades variadas que podem ir desde intensidades subclínicas (animais sem presença de sintomas clínicos) até a infeções agudas [117]. Outras doenças incluem a sinovite e a osteoartrite em galinhas, perus e outras aves [117]. Embora a infeção por este patogénico não cause na maioria das vezes a morte dos animais, a sua saúde fica fragilizada, sendo responsável pela claudicação da ave, pelo seu retardo no crescimento, por uma redução da produção de ovos e por um aumento de deformidades no ápice da casca dos ovos [114], [118], [119].

Para combater as infeções provocadas pelo MG e MS normalmente são administrados antibióticos. Contudo, para além deste tipo de tratamento apenas atenuar os sintomas e não eliminar estes microrganismos [120], um aumento de resistência a antibióticos pelas estirpes é observado [121]. Assim, as vacinas vivas atenuadas (LAV, do inglês *live attenuated vaccines*) têm sido usadas de modo a evitar e reduzir a proliferação destas bactérias [115]. Estas desencadeiam uma resposta imune semelhante à da infeção do animal por uma estirpe selvagem, aumentando a proteção do hospedeiro contra infeções subsequentes [122].

Em relação aos diferentes tipos de amostras normalmente analisados para a deteção deste patogénico pode-se referir essencialmente amostras de sangue [123] ou órgãos do trato respiratório ou zaragatoas esfregadas em locais do sistema respiratório (sistema alvo desta bactéria) [115], [124]. Tal como no caso da *Leptospira* as amostras de sangue são normalmente utilizadas para métodos serológicos, enquanto que as amostras do sistema respiratório são normalmente analisadas por PCR em tempo real como se pode verificar no estudo [125].

O diagnóstico do *Mycoplasma* pode ser realizado por métodos serológicos e a técnica de PCR. Em relação aos métodos serológicos usados para diagnosticar esta bactéria podem-se referir, entre outros, os testes rápidos de aglutinação (RPA, do inglês *rapid plate agglutination*) [126], o teste de inibição da hemaglutinação (HI, do inglês *hemagglutination inhibition*) [127] e mais recentemente o teste de ELISA [128]. No caso do uso da técnica de PCR para a deteção desta bactéria esta é uma técnica rápida e sensível [129] e a escolhida por muitos autores como se pode observar pela literatura [130], [129], [113].

As principais desvantagens dos métodos serológicos passam pelo facto de não permitirem o diagnóstico da bactéria na fase inicial, por os anticorpos ainda não estarem presentes [129] e de, por vezes os resultados não serem fidedignos devido à capacidade

deste microrganismo de variar a composição dos seus antígenios [131]. Deste modo, métodos culturais ou moleculares como a técnica de PCR são usados como alternativa. Como a cultura da bactéria implica maior tempo até obtenção do resultado e um maior risco de contaminação, o método de detecção por PCR torna-se mais vantajoso [116], [129].

2.5 Técnica de PCR para o diagnóstico de doenças em produções intensivas

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) é uma técnica muito importante na área de Biologia Molecular. Relatada pela primeira vez na década de 1970 [132], foi através do Kary Mullis em 1985 que foi desenvolvida como uma ferramenta de pesquisa [133]. Esta permite a amplificação de uma cadeia simples de DNA em milhões de cópias num curto espaço de tempo através do uso de *primers* e de uma polimerase de DNA [134].

Desde o seu desenvolvimento até à atualidade, o PCR tornou-se uma ferramenta essencial para a detecção de microrganismos. Das várias evoluções deste método, uma consistiu no desenvolvimento do PCR quantitativo (qPCR, do inglês *quantitative PCR*) também denominado de PCR em tempo real e que permite a quantificação dos ácidos nucleicos. Nesta técnica, corantes intercalantes de DNA fluorescentes ou sondas marcadas com corante fluorescente são usadas na *Master Mix*, permitindo a monitorização contínua da reação de amplificação – Figura 3a). Nessa monitorização são obtidos para padrões com concentração conhecida, os ciclos em que o composto fluorescente atinge determinado limite (o valor do ciclo de limiar, C_T). Com a concentração de cada padrão e após se obter os valores de C_T constrói-se um gráfico e obtém-se a respetiva equação da reta – Figura 3b) – com o qual se calcula através do C_T das amostras a quantidade do analito [135].

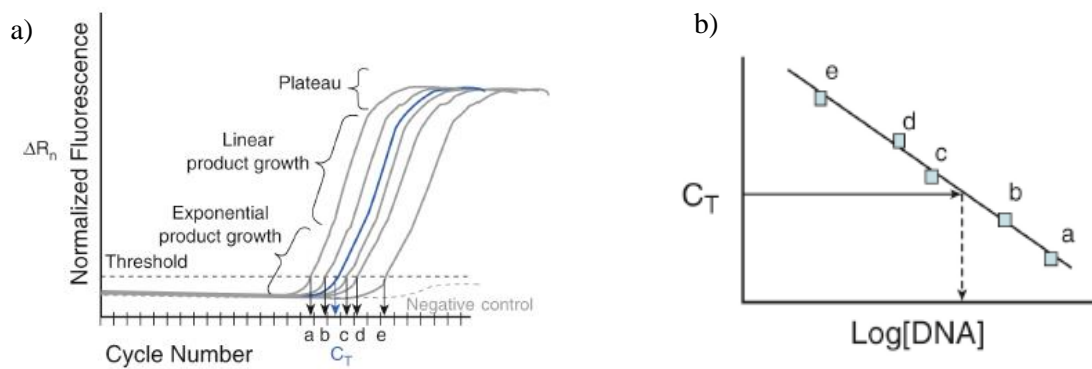


Figura 3. a) Gráfico de amplificação com as diferentes fases resultante do método de PCR em tempo real; b) Curva padrão usada para determinar a quantidade de DNA/RNA. Retirado de [136].

Em relação às principais vantagens e desvantagens do PCR em tempo real em comparação com o PCR clássico pode-se referir como vantagens: o aumento da rapidez de análise e a capacidade de quantificação do ácido nucleico alvo. No caso das desvantagens estas consistem na incompatibilidade de certas plataformas com alguns fluorescentes químicos, e a necessidade de equipamentos e reagentes de custo elevado (e.g termociclador) [137].

Em produções intensivas o uso da técnica de PCR tem vindo a ganhar destaque para a deteção de agentes patogénicos que causem doenças nos animais [138], incluindo o PRRSV, o PCV2, *Leptospira*, *Mycoplasma* e também na identificação de fatores de virulência de *E. coli*.

Relativamente ao uso desta técnica para a deteção de PRRSV, tanto a ORF7 como a ORF5 demonstraram ser sequências adequadas para identificar ambas as variantes deste patogénico por PCR em amostras de sangue, fluidos orais e amostras de órgãos/tecidos como pulmões ou amígdalas [139]–[142]. Para além disso, também se verificou que entre a técnica de RT-PCR tradicional, a RT-PCR em tempo real usando sondas *Taqman* e a RT-PCR em tempo real usando o corante SYBR Green, a técnica de RT-PCR em tempo real que usava os corantes *Taqman* foi a técnica de PCR mais exata e sensível para detetar o PRRSV [143].

Em relação ao uso da PCR para a deteção de PCV2, verifica-se que a sequência da ORF2 é eficaz para identificar este patogénico, permitindo, também, diferenciar as suas variantes em amostras de soro, órgãos/tecidos, fluidos orais e fecais [37], [144]–[147]. Deste modo, a ORF2 é normalmente a ORF escolhida na maioria dos estudos como alvo de amplificação pela técnica de PCR [37], [144]–[147]. Assim, apesar de a técnica

de PCR não ser tão rigorosa na detecção das variantes de PCV2, em comparação com outros métodos como a sequenciação de Sanger, esta permite igualmente uma detecção sensível e específica das variantes, sendo um método rápido [37].

No caso da identificação de *Leptospira* patogénicas, vários estudos [73], [148]–[150] procedem à sua detecção através da aplicação de PCR em tempo real para complementação ou comparação com outros métodos serológicos ou culturais. As técnicas de PCR usadas para detetar esta bactéria baseiam-se no uso de *primers* que flanqueiem os genes *lipL32* de bactérias patogénicas e as amostras de suínos mais comumente analisadas incluem amostras provenientes do sistema urinário e reprodutor [73], [148]–[150]. No caso do uso de qPCR um sinal é emitido aquando da presença destas bactérias patogénicas, não se verificando emissão de qualquer sinal quando *Leptospira* intermédias e saprófitas são analisadas, assim esta técnica de PCR demonstra ser sensível e específica para a análise de *Leptospira* patogénicas [73].

Para a detecção de fatores de virulência da *E. coli* como a presença das adesinas fimbriais F4 e F18 a técnica de PCR é um dos métodos preferenciados como evidenciado pelos seguintes estudos [88], [107], [151]. Os alvos de amplificação são respetivamente os genes que codificam as adesinas F4 e F18 e as amostras analisadas correspondem a amostras do trato gastrointestinal [88], [107], [151].

Relativamente à detecção de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* pelo método de PCR verificou-se que tanto os genes *mgc2*, o gene da subunidade 16S do RNA ribossomal, o gene da lipoproteína e o gene *gapA* são eficazes para detetar o *Mycoplasma gallisepticum* e que o gene da subunidade 16S do RNA ribossomal é eficaz para detetar o *Mycoplasma synoviae* em amostras de fluidos orais de aves [113], [129], [152]–[154]. Em relação a estes patogénicos também se verificou que o uso de qPCR *multiplex* permitiu detetar simultaneamente as estirpes MG e MS não havendo interferência/inibição na detecção de MG ou MS mesmo que uma maior concentração de uma das estirpes estivesse presente nas amostras [113]. Assim, o qPCR *multiplex* é um método eficaz e mais económico que a qPCR *simplex* que deteta apenas uma estirpe. Para além disso, ambas estas estirpes de *Mycoplasma* são frequentes agentes de infeção em produções intensivas de aves o que torna o uso de qPCR *multiplex* vantajoso [113].

2.6 Objetivos do estágio

Atualmente o Laboratório Tomaz analisa diretamente pelo método de ELISA a presença de *Mycoplasma gallisepticum*, o *Mycoplasma synoviae* e o vírus PRRSV. Como tal, sempre que é necessário diagnosticar quer o PRRSV, quer o *M. gallisepticum* e/ou *M. synoviae*, a *Leptospira* ou o PCV2 por PCR esta análise é feita recorrendo a empresas subcontratadas. Assim, é do interesse do laboratório implementar técnicas de diagnóstico baseadas em PCR em tempo real para análise de amostras de Veterinária, a partir de diferentes matrizes, nomeadamente, amostras de sangue (soro), zaragatoas (fluidos orais), fezes ou amostras de órgãos/tecidos (ex: pulmões, caudas, intestinos, etc) (Figura 4).



Figura 4. Amostra de caudas de suíno para análise de PRRSV por PCR.

Assim, os principais objetivos deste estágio são pesquisar e quantificar agentes patogénicos em amostras de produção intensiva através da técnica de PCR em Tempo Real nomeadamente, o PRRS (Síndrome Reprodutivo e Respiratório Suíno, do inglês *Porcine Reproductive and Respiratory syndrome*), *Leptospira*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* e o Circovírus 2. Pretende-se também, pesquisar os fatores de virulência da *Escherichia coli* em fezes de animais.

III. Materiais e Métodos

3.1 Amostras

No total foram analisados 4 tipos de amostras de acordo com o pedido de análise efetuado ao Laboratório Tomaz: amostras de órgãos/tecidos de suínos para o despiste de *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV), de *Leptospira* spp. e de *Porcine Circovirus Type 2* (PCV2), amostras de soros de suínos para despiste de PRRSV e PCV2, fezes de suínos para pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* e finalmente amostras de fluidos orais de aves para pesquisa de *Leptospira* spp. e de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*.

No dia 22 de janeiro de 2021, o Laboratório Tomaz recebeu amostras de tecidos (caudas de leitões da mesma ninhada) e um órgão de suíno (pulmão) colhidas nesse dia. As amostras foram armazenadas a -20°C e analisadas entre 48-72h após a colheita.

Quanto às amostras de soro de suíno foram analisadas amostras rececionadas em dois momentos (5 e 23 de Abril de 2021), armazenadas a 4°C e analisadas entre 24 -72h.

Para a análise dos fatores de virulência de *E. coli*, o Laboratório recebeu uma amostra de fezes de suínos para pesquisa dos fatores de virulência F4 e F18 no dia 6 de Abril de 2021, colhidas no dia anterior. Na pesquisa de *Leptospira* e de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foram analisadas, respetivamente, 2 e 13 *pools* de amostras de fluidos orais colhidos com zaragatoas na zona traqueal de galinhas poedeiras que tinham idade compreendida entre 8 a 10 semanas. Cada *pool* continha o correspondente a quatro a cinco zaragatoas individuais, recolhidas num período de tempo entre 24 de Janeiro de 2021 até 26 de Maio de 2021. Após a sua receção as zaragatoas foram armazenadas a 4°C e analisadas entre 24 -72h após a colheita.

3.2 Extração de DNA/RNA

A extração de DNA/RNA foi realizada recorrendo ao *ID. Gene TM Spin Universal Extraction Kit* (Ref: SPIN50/SPIN250, ID.Vet GENETICS) seguindo as instruções do fabricante. Para efeito de simplificação, este protocolo foi dividido em duas partes: (1)

3.2.1 Isolamento e concentração de DNA/RNA (subdividido em quatro partes consoante o tipo de matriz, órgãos/tecidos, soros, zaragatoas e fezes), e (2)

3.2.2 Purificação do DNA/RNA (procedimento idêntico para todos os tipos de amostras).

Para a detecção do PRRSV realizou-se a extração de RNA e para a detecção do PCV2, de *Leptospira*, de *Mycoplasma* e dos fatores de virulência da *E. coli* efetuou-se a extração de DNA.

3.2.1 Isolamento e concentração de DNA/RNA

3.2.1.1 Amostras de órgãos/tecidos

Num tubo de 15 mL (Normax, Marinha Grande, Portugal) pesou-se cerca de 20 mg do órgão e/ou tecido, previamente dissecado, e adicionou-se 1 mL de 1×PBS. De seguida, colocaram-se três *glass beads*, homogeneizou-se no vórtex (VORTEX 2, IKA, Staufen, Alemanha) e centrifugou-se na centrífuga (Hettich Zentrifugen Mikro 220/220R, Alemanha) a 1500 xg durante 2 minutos. Num novo tubo de 1,5 mL respetivamente identificado, adicionou-se 600 µL de tampão de lise (*RAVI-Carrier*) e 20 µL de proteinase K. Após a centrifugação, retirou-se 100 µL de sobrenadante para o tubo e incubou-se a 70°C (±5°C) durante 30 minutos num bloco de aquecimento (*Thermal Shake lite*, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA). Após os 30 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo mantendo-se apenas as células lisadas. Estas foram ressuspensas em 600 µL de etanol absoluto. Todos os passos, exceto as centrifugações e a incubação no bloco de aquecimento, foram realizados numa câmara de fluxo laminar (S@femate Ez 1.2, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA).

3.2.1.2 Amostras em zaragatoas

Adicionou-se 1 mL de 1×PBS num tubo de 15 mL e cortou-se com o auxílio de uma tesoura esterilizada as varas de zaragatoas (*pool*), garantido que o esfregão estava imerso na solução. De seguida, o tubo foi colocado no vórtex por 30 segundos para garantir que a amostra retida na zaragatoa era transferida para o tampão PBS. A um novo tubo de 1,5 mL, respetivamente identificado, adicionou-se 600 µL de tampão de lise e 20 µL de proteinase K. Por fim, adicionou-se 100 µL da amostra ao tubo e incubou-se a 70°C (±5°C) durante 30 minutos num bloco de aquecimento (*Thermal Shake lite*, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA). Após os 30 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo mantendo-se apenas as células lisadas. Estas foram ressuspensas adicionando 600 µL de etanol absoluto. Todos os passos, exceto a incubação no bloco de aquecimento, foram realizados numa câmara de fluxo laminar (S@femate Ez 1.2, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA).

3.2.1.3 Amostras de fezes

Num tubo de 90 mL, pesou-se cerca de 5 mg de amostras de fezes e adicionou-se 30 mL de água estéril. Levou-se o tubo ao vórtex durante 30 s e deixou-se a amostra em repouso durante 10 min (± 2 min). Pipetou-se, de seguida, 1,5 mL de amostra para um novo tubo de 1,5 mL e centrifugou-se a amostra durante 10 min a 11300 xg. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante por inversão e ressuspendeu-se o *pellet*, adicionando-se 600 μ L de tampão de lise e 20 μ L da proteinase K. Fez-se vórtex e incubou-se a amostra a 70°C ($\pm 5^\circ$ C) durante 30 min no bloco de aquecimento (Thermal Shake *lite*, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA). Após a incubação, centrifugou-se a 11 300 xg durante 3 min. Num outro tubo de 1,5 mL adicionou-se 500 μ L de etanol absoluto e 500 μ L do sobrenadante da amostra com o auxílio da micropipeta (100-1000 μ L, Sartorius, Göttingen, Alemanha), homogeneizando-se de seguida. Todos os passos, exceto as centrifugações e a incubação no bloco de aquecimento, foram realizados numa câmara de fluxo laminar (S@femate Ez 1.2, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA).

3.2.1.4 Amostras de soro

A separação do soro do sangue total foi feita por centrifugação a 3000 xg durante 10 minutos. O soro (sobrenadante) foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 600 μ L de tampão de lise e 20 μ L de proteinase K num novo tubo de 1,5 mL. De seguida, colocou-se 100 μ L de amostra de soro no tubo de 1,5 mL. Se se tratasse de uma *pool* de amostras de soros colocavam-se volumes iguais de cada soro no tubo de 1,5 mL de modo a que o volume total fosse 100 μ L. Exemplo: na *pool* com 4 soros, colocamos 25 μ L de cada soro individual ($V_f=100$ μ L). Seguidamente, a amostra foi levada ao vórtex por 20 s e incubada a 70°C ($\pm 5^\circ$ C) durante 30 min no bloco de aquecimento (Thermal Shake *lite*, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA). Após os 30 minutos, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo mantendo-se apenas as células lisadas. Estas foram ressuspendidas em 600 μ L de etanol absoluto. Todos os passos, exceto a centrifugação e a incubação no bloco de aquecimento, foram realizados numa câmara de fluxo laminar (S@femate Ez 1.2, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA).

3.2.2 Purificação do DNA/RNA

A purificação do DNA/RNA foi imediatamente realizada para todos os tipos de amostras, seguindo as instruções do fabricante. Transferiu-se 660 µL do lisado para a respetiva coluna, centrifugando-se de seguida a 8000 xg durante 1 min. O eluato foi descartado e a coluna colocado num novo tubo coletor. Este passo foi repetido para a totalidade da amostra. De seguida, pipetou-se 500 µL de tampão *RAW* para cada coluna e centrifugou-se a 8000 xg durante 1 min. Após a centrifugação, descartou-se o tubo coletor e o eluato e colocou-se a coluna num novo tubo coletor. Pipetou-se 600 µL de tampão *RAV3* para cada coluna, centrifugou-se a 8000 xg durante um minuto, descartou-se o eluato e colocou-se a coluna num novo tubo. Este foi centrifugado a 11 000 xg durante 3 min para garantir que possíveis vestígios de interferentes eram eluídos e descartou-se o tubo, mantendo-se a coluna. Por fim, a coluna foi colocada num novo tubo de 1,5 mL já identificado ao qual se adicionou 100 µL de ELU caso se pretendesse obter DNA ou 100 µL de RNase-Free H₂O caso se pretende-se extrair RNA. Manteve-se a incubar durante 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-se uma última vez a 8000 xg durante 1 min, descartando-se de seguida a coluna e mantendo o tubo com o eluído. Este era armazenado a -20°C ± 5°C caso não fosse analisado imediatamente. Todos os passos, exceto as centrifugações foram realizados numa câmara de fluxo laminar (S@femate Ez 1.2, VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA).

3.3 Amplificação do DNA/RNA por qPCR

3.3.1 Pesquisa de PRRSV

A pesquisa de PRRSV foi feita utilizando o ViroReal® Kit PRRSV Virus EU & NA 1.1 da *ingenetix* (Ref: DVEV00113). Este *kit* baseia-se na aplicação de transcrição reversa por PCR em tempo real (RT-PCR) para a transcrição de uma sequência específica de RNA em DNA complementar, amplificado e detetado por uma sonda de oligonucleotídeos marcada com um corante fluorescente. Para a pesquisa de PRRSV é feita a deteção da Open Reading Frame 7 (ORF7), incluindo a região 3'-não traduzida, de ambas as variantes de PRRSV, variante europeia e variante americana (PRRSV EU e NA). A ORF7 da variante europeia é detetada no canal FAM e a ORF7 da variante americana é detetada no canal VIC ou HEX. Para evitar resultados falsos-negativos é utilizado um controlo endógeno de RNA detetado no canal Cy5. Como controlo positivo

é utilizado o vírus PRRS EU e NA com concentração aproximada de 50 000 000 cópias de RNA/mL e como controlo negativo é usada água livre de nucleases.

Preparou-se uma *Master Mix* num tubo estéril considerando o número de amostras a analisar e controlos. Para cada reação (com volume final de 20,0 µL) foram necessários: 2,0 µL de água livre de nucleases, 5,0 µL de RNA *Reaction Mix*, 1,0 µL de PRRS Virus EU + NA *Assay Mix* 1.1 (*primers* e sondas FAM e VIC/HEX), 1,0 µL de RNA IPC *Assay Mix* (*primers* e sonda Cy5 para deteção de controlo endógeno) e 1,0 µL de RNA IPC *Target* (controlo endógeno 1:500). Após a preparação da *Master Mix* homogeneizou-se e distribuiu-se 10 µL para cada tubo de PCR. De seguida adicionou-se 10,0 µL de amostra e/ou controlo, fecharam-se os tubos de PCR com as tampas e fez-se uma centrifugação durante 20 s na mini centrífuga para homogeneizar e remover eventuais bolhas. Por último, limpou-se com papel as tampas dos tubos de PCR para remover possíveis marcas digitais e colocaram-se os tubos no termociclador (CFX96 Deep Well™, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para a realização do PCR em tempo real. O perfil térmico usado foi de três etapas (1 ciclo de 50°C durante 15 min, seguido de 1 ciclo de 95°C durante 20s e por último 45 ciclos com 95°C por 5s e 60°C por 1 min, com aquisição de dados na fase do *annealing*, ou seja, a 60°C). O *software* utilizado para aquisição de dados e análise de resultados foi o *Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2*. A interpretação de resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

3.3.2 Pesquisa de PCV2

A deteção do PCV2 foi feita através do *kit* da EXOone PCV2 oneMIX da *exopol* (Ref: No. PCV2_MIX). O seu princípio baseia-se na amplificação e quantificação de uma sequência específica de DNA através do uso de uma sonda fluorescente (que inclui um corante repórter e um corante *quencher*) pelo método de PCR em tempo real. A ORF2 que codifica para o gene do capsídeo do PCV2 é detetada no canal FAM. Para evitar resultados falsos-negativos é usado um controlo endógeno detetado no canal HEX ou VIC. Como controlo positivo é utilizado um controlo positivo sintético com 5×10^5 cópias de DNA/ 5 µL e como controlo negativo é usada água livre de nuclease.

Homogeneizou-se a *Master Mix* e pipetou-se 15 µL desta solução para cada tubo de PCR, volume necessário para cada amostra e/ou controlo, com o auxílio da micropipeta (2-20 µL, Acura® manual 825, Socorex, Ecublens, Suíça). De seguida, adicionou-se 5,0 µL de amostra e/ou controlo, fechou-se os tubos de PCR com as tampas e fez-se uma

centrifugação na mini centrífuga para homogeneizar e remover eventuais bolhas (volume final de reação de 20 μ L). Por último, limpou-se com papel as tampas dos tubos de PCR para remover possíveis marcas digitais e colocaram-se os tubos no termociclador (CFX96 Deep Well™, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para a realização do PCR em tempo real. O perfil térmico usado foi de duas etapas (1 ciclo de 95°C durante 5 min, seguido de 42 ciclos com 95°C por 15s e 60°C por 1 min, com aquisição de dados na fase do *annealing*, ou seja, a 60°C). O *software* para aquisição de dados e análise de resultados foi o *Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2*. A interpretação de resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

Para a quantificação do DNA de PCV2 de amostras de soro foi necessário preparar uma reta padrão usando o controlo positivo fornecido pelo *kit*. A partir da concentração inicial do controlo positivo fornecido (5×10^5 cópias de DNA/ 5 μ L) e de água livre de nucleases seis diluições em séries de 10 foram realizadas com concentrações compreendidas entre 5×10^4 cópias de DNA até 5×10^{-1} cópias de DNA em tubos de 1,5 mL. Homogeneizou-se a *Master Mix* e pipetou-se 15 μ L desta solução para cada tubo de PCR, volume necessário para cada ponto da reta padrão. De seguida, adicionou-se 5,0 μ L de cada padrão, fazendo-se duas réplicas por cada diluição e fechou-se os tubos de PCR com as tampas e fez-se uma centrifugação na mini centrífuga para homogeneizar e remover eventuais bolhas (volume final de reação de 20 μ L). Por último, limpou-se com papel as tampas dos tubos de PCR para remover possíveis marcas digitais e colocaram-se os tubos no termociclador (CFX96 Deep Well™, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para a realização do PCR em tempo real. O perfil térmico e o *software* para aquisição de dados usados foram iguais ao mencionado anteriormente.

3.3.3 Detecção da *Leptospira* spp.

A deteção da *Leptospira* spp. foi feita através do *kit* da EXOone Pathogenic *Leptospira* oneMIX da *exopol* (Ref: No. LEPT_MIX). Este *kit* validado para o PCR em tempo real baseia-se na transcrição e amplificação de uma sequência específica de genes de DNA de estirpes de *Leptospira* patogénicas. Na amplificação um corante fluorescente (que inclui um corante repórter e um corante *quencher*) é usado e um sinal do corante repórter é emitido e proporcional à quantidade de DNA amplificado. Este *kit* deteta a presença do gene *lipL32* presente em estirpes de *Leptospira* patogénicas no canal FAM. O controlo endógeno é detetado no canal HEX para extrair resultados falsos-negativos.

Como controlo positivo é utilizado o controlo positivo sintético com concentração de 5×10^5 cópias de DNA/ 5 μL e como controlo negativo é usada água livre de nuclease.

Homogeneizou-se a *Master Mix* e pipetou-se 15 μL desta solução para cada tubo de PCR volume necessário para cada amostra e/ou controlo. De seguida, adicionou-se 5,0 μL de amostra e/ou controlo, fechou-se os tubos de PCR com as tampas e fez-se uma centrifugação na mini-centrifuga para homogeneizar e remover eventuais bolhas. Por último, limpou-se com papel as tampas dos tubos de PCR para remover possíveis marcas digitais e colocaram-se os tubos no termociclador (CFX96 Deep Well™, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para a realização do PCR em tempo real. O perfil térmico usado foi de duas etapas (1 ciclo de 95°C durante 5 min, seguido de 42 ciclos com 95°C por 15s e 60°C por 1 min, com aquisição de dados na fase do *annealing*, ou seja, a 60°C). O *software* para aquisição de dados e análise de resultados foi o *Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2*. A interpretação de resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

3.3.4 Pesquisa de fatores de virulência de *E.coli*

A pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* foi feita utilizando o *BactoReal® Typing Kit E. coli v1.1* da *ingenetix* (Ref: DVET001). Este *kit* tem conjuntos de *primers* específicos para a deteção de 18 genes que codificam para fatores de virulência de *E. coli* associados a suínos nomeadamente adesinas fimbriais, enterotoxinas e outras adesinas que codificam respetivamente para as adesinas, F4, F5, F6, F18, F41 as toxinas STa1, STb2, STx2e, LT, EAST1 e as adesinas fimA, pAA, escV, cnf1, iucD, papC e pic. Este *kit* baseia-se na amplificação de um fragmento específico de DNA de um determinado gene de virulência por PCR em tempo real, sendo o produto detetado através de um agente intercalante (*SYBR green*) e posterior análise das curvas de *melting* a 515 nm, considerando as instruções do fabricante. Como controlo positivo é utilizada uma estirpe de *E. coli* que apresenta todos os fatores de virulência em análise, e como controlo negativo é usada água livre de nuclease.

Foi preparada uma *Master Mix* para cada gene a detetar uma para a deteção da adesina fimbrial F4 e outra para a F18. Para cada adesina preparou-se a *Master Mix* num tubo estéril de 1,5 mL, considerando o número total de amostras e controlos em análise. Para cada reação foi preparada uma *Master Mix* (volume final de 19,0 μL) contendo 14,0 μL de H₂O, 4,0 μL de 5 \times HR *Master Mix* (com o controlo endógeno ROX) e 1,0 μL

de conjunto de *primers* da *E. coli Assay Mix* que se pretendia analisar. Aos 19 μ l de *Master Mix* foi adicionado 1 μ L de DNA obtido da extração das amostras de fezes ou controlo a analisar, perfazendo um volume final de 20 μ L. Os tubos foram colocados no termociclador (CFX96 Deep Well™, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para a realização do PCR em tempo real. O perfil térmico usado foi de três etapas (1 ciclo de 50°C durante 2 min, 1 ciclo de 95°C durante 10 min, seguido de 35 ciclos com 95°C por 15s e 60°C por 1 min, com aquisição de dados na fase do *annealing* ou seja, a 60°C). O ciclo da curva de *melting* seguiu as seguintes condições 95°C durante 15s, 60°C durante 1 min, 95°C por 30s e 60°C durante 15s. O *software* para aquisição de dados e análise de resultados foi o *Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2*. A interpretação de resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

3.3.5 Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*

A pesquisa de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em amostras traqueais recolhidas em zangãos foi feita utilizando DNA extraído como descrito em 3.2 e o *BactoReal® Kit Mycoplasma gallisepticum & synoviae* da *ingenetix* (Ref: DVEB05753). Este *kit* foi desenvolvido para a deteção e diferenciação entre *M. gallisepticum* e *M. synoviae* usando um ensaio *multiplex* de PCR em tempo real. Para tal, tem como alvo o gene *mgc2* (que codifica para uma proteína semelhante à citadesina) para a deteção do *M. gallisepticum*, e o gene *vlhA* (que codifica para a hemaglutinina) para a deteção do *M. synoviae*. Após amplificação, o produto de PCR é detetado por uma sonda marcada. Enquanto que a amplificação de DNA específico de *M. gallisepticum* é detetada no canal FAM (530 nm), no caso de *M. synoviae* é detetada no canal VIC/ HEX (554 nm). Para extrair resultados falsos-negativos é utilizado um controlo endógeno detetado no canal Cy5 (667 nm). Como controlos positivos é utilizado DNA de estirpes de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* com concentração aproximada de 10 000 cópias de DNA/mL. Como controlo negativo foi usada água livre de nuclease.

Preparou-se a *Master Mix* num tubo de 1,5 mL considerando as amostras e controlos totais, sendo que por cada amostra e/ou controlo era necessário a *Master Mix* ter 3,0 μ L de água livre de nucleases, 10,0 μ L de DNA Reaction Mix, 1,0 μ L de *M. gallisepticum* & *M. synoviae* Assay Mix (*primers* e sondas FAM e VIC/HEX para deteção de *M. gallisepticum* & *M. synoviae*) e 1,0 μ L de CR-3 Assay Mix (*primers* e sonda Cy5 para deteção do controlo endógeno). Após a preparação da *Master Mix*

homogeneizou-se a mesma manualmente e pipetou-se 15 μ L para cada tubo de PCR. De seguida adicionou-se 5,0 μ L de DNA obtido de amostras e/ou controlo, fechou-se os tubos de PCR com as tampas e fez-se uma centrifugação na mini centrífuga para homogeneizar e remover eventuais bolhas. Por último, limpou-se com papel as tampas dos tubos de PCR para remover possíveis marcas digitais e colocaram-se os tubos no termociclador (CFX96 Deep Well™, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para a realização do PCR em tempo real. O perfil térmico usado foi de três etapas (1 ciclo de 50°C durante 15 min, seguido de 1 ciclo de 95°C durante 20 s e por último 45 ciclos com 95°C por 5 s e 60°C por 1 min, com aquisição de dados na fase do *annealing* ou seja, a 60°C). O *software* para aquisição de dados e análise de resultados foi o *Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2*. A interpretação de resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

IV. Resultados e Discussão

4.1 Detecção de PRRSV em amostras de órgãos/tecidos e soros de suínos

Para a identificação do PRRSV por PCR em tempo real foram utilizadas diferentes matrizes, tais como, caudas de suínos, pulmão e soro. Foram realizados dois ensaios.

No primeiro ensaio foram analisados dois tipos de amostras: uma *pool* de amostras de caudas de suínos de 2ª ninhada, lote 655, com o código de identificação do Laboratório Tomaz número 3333 e uma amostra de pulmão, lote 590, codificada com o número 3336. A amostra de pulmão foi analisada em paralelo por um laboratório contratado para a pesquisa do mesmo patogénico.

No segundo ensaio foram analisadas seis *pools*, cada uma constituída por quatro soros (N=4), com os números de codificação interna entre 21540 (1ª *pool*) a 21545 (6ª *pool*).

Os resultados das curvas de amplificação obtidos para o primeiro ensaio podem ser observados na Figura 5.

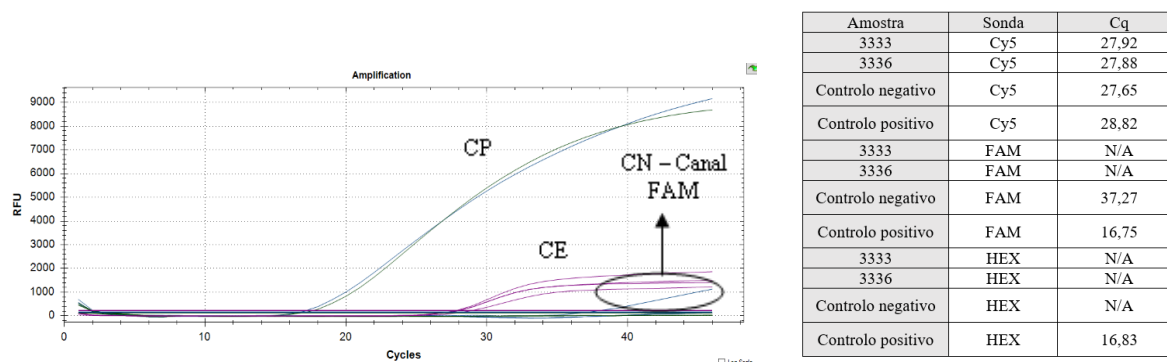


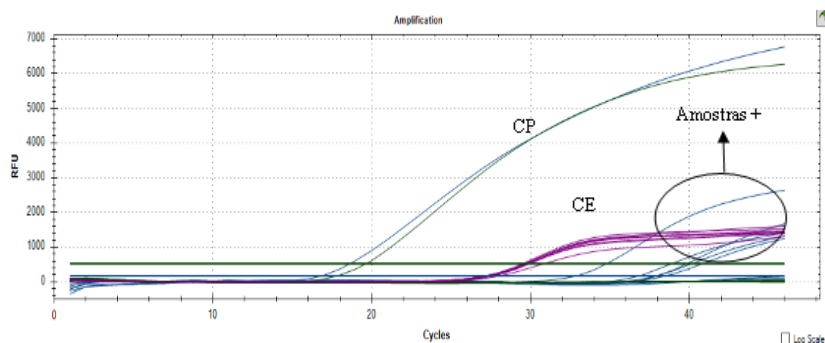
Figura 5. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras de órgãos/tecidos e respetivos valores de C_T para a deteção do PRRSV. CP - controlo positivo; CN – controlo negativo; CE – controlo endógeno; FAM – sonda de identificação da estirpe europeia (curva azul); HEX – sonda de identificação da estirpe americana (curva verde); Cy5 – sonda do controlo endógeno (curva rosa).

Analisando os resultados da Figura 5, verifica-se que ambas as amostras 3333 e 3336 são negativas para PRRSV, sem a presença de curvas de amplificação nas sondas FAM e HEX. De acordo com a interpretação do *kit* utilizado (tabela A1 – em anexo), e analisando os resultados obtidos, considera-se que o controlo positivo está válido, com amplificação nos canais FAM, HEX e Cy5, apesar dos valores de C_T 's nos canais FAM e HEX estarem abaixo do esperado. Esta diferença nos valores de C_T 's deve estar

relacionada com a diluição recomendada pelo *kit* (1/10), que não foi feita nesta corrida. No caso do controlo negativo, seria de esperar que não existisse amplificação nos canais FAM e HEX, mas como se pode verificar na Figura 6, existiu uma ligeira amplificação do canal FAM ($C_T=37,27$), indicando que ocorreu uma contaminação do controlo negativo. Nestes casos, o laboratório não valida a sessão de trabalho, tendo-se de repetir a corrida. No presente caso, e como esta corrida foi feita apenas para obter resultados para este trabalho de dissertação, não foi feita a repetição da mesma. Uma vez que as amostras se encontram negativas, considera-se que a contaminação tenha ocorrido durante a fase de preparação de pipetagem dos extratos à *Master Mix* e não durante a fase de extração.

A amostra 3336 (amostra de pulmão) que foi analisada, também, por outro laboratório obteve um resultado negativo. Este resultado encontra-se concordante com o resultado obtido nesta dissertação.

Para além destas duas amostras de órgãos/tecidos, foram também analisados soros de porco em relação à presença deste patogénico. Neste caso, analisou-se 6 *pools* (cada *pool* com quatro soros de porcos individuais) – Figura 6.



Amostra	Sonda	Cq
21540	Cy5	27,16
21541	Cy5	27,00
21542	Cy5	27,06
21543	Cy5	27,34
21544	Cy5	27,25
21545	Cy5	27,10
Controlo negativo	Cy5	27,41
Controlo positivo	Cy5	27,89
21540	FAM	32,77
21541	FAM	37,86
21542	FAM	37,79
21543	FAM	36,73
21544	FAM	38,36
21545	FAM	N/A
Controlo negativo	FAM	N/A
Controlo positivo	FAM	16,72
21540	HEX	N/A
21541	HEX	N/A
21542	HEX	N/A
21543	HEX	N/A
21544	HEX	N/A
21545	HEX	N/A
Controlo negativo	HEX	N/A
Controlo positivo	HEX	19,58

Figura 6. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respetivos valores de C_T para a deteção do PRRSV. CP-controlo positivo; CE - controlo endógeno, Amostras + - amostras positivas para o FAM (curva azul).

Como se pode visualizar na Figura 6, todas as *pools* analisadas demonstraram amplificação para a variante europeia deste vírus (sonda FAM), exceto a *pool* da amostra 21545. Com efeito, de acordo com a Tabela A1 em anexo, considera-se uma amostra

positiva para o PRRSV EU quando o canal FAM amplifica e positiva para o PRRSV NA quando o canal HEX apresenta amplificação. O controlo endógeno (canal Cy5) pode nem sempre amplificar em amostras positivas, dependendo da carga viral do patogénico, ou seja, valores de C_T 's mais baixos podem apresentar amplificações tardias ou nulas do canal Cy5, enquanto em amostras mais fracamente positivas (valores de C_T 's mais altos) é esperado um sinal significativo de Cy5. Relativamente ao PRRSV NA, não foram detetadas amostras positivas (canal HEX sem amplificação). Por último, em relação aos controlos positivo e negativo estes foram aceites e os resultados considerados válidos, apesar de o valor de C_T do controlo positivo encontrar-se abaixo do indicado pelo fabricante.

Apesar de se ter analisado amostras de órgãos/tecidos e amostras de soro, não podemos neste caso comparar estes dois tipos de amostras para perceber qual é a melhor matriz na análise de deteção deste patogénico. Esta comparação não é possível pois as amostras analisadas não pertencem ao mesmo animal.

No entanto, se nos debruçarmos sobre a literatura podemos concluir que os soros deverão ser uma matriz mais eficaz na deteção deste patogénico em comparação com os órgãos/tecidos. Num estudo conduzido por Fan *et al.* 2019 [155], verificou-se que os soros eram a melhor matriz quando comparando com zaragatoas húmidas e/ou secas esfregadas em sangue. No entanto, e apesar de o soro ser em vários estudos considerado uma melhor matriz, o estudo de Plut *et al.* 2020 [29] concluiu que em estados finais da doença são os fluidos orais a melhor matriz, tendo em conta que os órgãos linfóides (zona onde se esfrega a zaragatoa) são os últimos órgãos a evidenciar este patogénico. Assim, e com base nos estudos da literatura, podemos considerar que tanto as zaragatoas, soros e órgão/tecidos são boas matrizes para a deteção do PRRSV, desde que a sua deteção seja feita numa fase inicial da doença.

Para além da importância da escolha da matriz que revele uma maior eficácia na deteção deste vírus, é importante compreender tanto a dificuldade obtida na colheita da amostra, como o nível de *stress* e sofrimento do animal. As amostras de alguns tecidos (e.g as caudas) podem apresentar um menor nível de *stress* ao animal. As caudas de suínos analisadas são na maioria das explorações de suinicultura cortadas para que os suínos não arranquem as caudas uns aos outros [156], enquanto que os soros são obtidos propositadamente para a análise e o animal sujeito a um nível de *stress* superior [27]. No caso dos órgãos, como por exemplo, o pulmão apesar de o animal não ser sujeito a *stress*

para a sua colheita, necessita por obrigatoriedade que o animal esteja ou seja morto [20] tornando-se, por vezes, pouco conveniente a sua análise.

Para além de ser importante perceber qual a melhor matriz para detetar a presença de PRRSV por PCR em tempo real, também é importante perceber qual o melhor método de preservação da amostra. Com efeito, no estudo de Fan *et al.* 2019 [155], onde examinaram diferentes matrizes para a deteção de PRRSV, foram também analisados diferentes materiais para a recolha, e ainda o processamento e armazenamento de amostras.

Analisando os resultados deste estudo [155] verificou-se que um maior número de RNA de PRRSV era detetado na seguinte ordem de matrizes: soro, zaragatoas húmidas de poliéster, zaragatoas húmidas de algodão, zaragatoas secas de poliéster e zaragatoas secas de algodão. Relativamente ao tempo de armazenamento, verificou-se de modo geral que a concentração de PRRSV era superior passado 72h de armazenamento em comparação com 24h. Após 7 dias, de modo geral, notava-se uma degradação no RNA, com o PRRSV a deixar de ser detetados no caso das zaragatoas secas de algodão armazenadas a 4°C. Tal, no entanto, não era linear com os soros a apresentarem muito pouca ou nenhuma alteração na concentração de PRRSV detetado passado os 7 dias. Assim, conclui-se que, regra geral, os soros sofrem uma menor degradação do RNA presente comparativamente às zaragatoas. Por último, em relação às temperaturas de armazenamento, comparando os resultados obtidos relativamente às amostras de soro, observamos ao fim de 24h e 72h que as alterações na quantidade de RNA de PRRSV detetado são reduzidas ou inexistentes, independentemente da temperatura de armazenamento. No entanto, ao fim de 7 dias uma diferença torna-se notável, com os soros armazenados a 4°C a sofrerem uma menor degradação de RNA em comparação com os armazenados a 20°C. Deste modo, e comparando com o nosso processamento das amostras de soros (que foram refrigerados a 4°C e analisados entre 24h a 72h horas após serem recolhidos) verifica-se que a temperatura e tempo de armazenamento foram indicados para uma extração de PRRSV eficaz.

4.2 Detecção de PCV2 em amostras de órgãos/tecidos e soros de suínos

As amostras das caudas de suínos (*pool*) e a amostra de pulmão, foram uma vez mais analisadas, mas para presença do vírus PCV2. Ambas as amostras não sofreram alteração na sua designação, com a amostra das caudas de suínos a ser designada com o número 3333 e a amostra de pulmão com o número 3336.

Após a obtenção dos resultados, estes para serem válidos tinham que obedecer aos princípios indicados pelo fornecedor (Tabela A2 em anexo). Inicialmente, foram feitas corridas de PCR onde se constatou a ausência de sinal do canal HEX tanto para o controlo positivo, como para o controlo negativo, mas com o mesmo a demonstrar amplificação em amostras reais.

De acordo com o fabricante o controlo endógeno utilizado neste *kit* utiliza um gene *housekeeping* presente nas células animais. Portanto, é esperado que não exista amplificação do canal HEX no controlo negativo, uma vez que este corresponde a água livre de nucleases. No caso do controlo positivo apenas devemos considerar o FAM positivo.

Em relação às amostras positivas, dependendo do valor de C_T , pode existir ou não amplificação do controlo endógeno. Amostras com valores de C_T 's muito baixos, apresentam uma carga viral alta, o que faz com que exista competição dos oligonucleótidos durante os ciclos de amplificação, e por esse motivo, o controlo endógeno não apresenta curva de amplificação ou é praticamente nula. As curvas de amplificação e os respetivos valores de C_T da *pool* de caudas e do pulmão estão representadas na Figura 7.

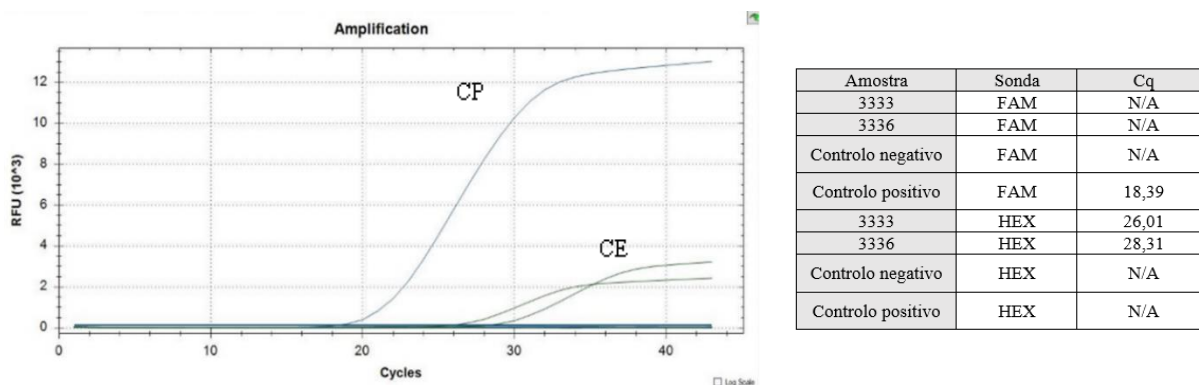


Figura 7 Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de órgãos/tecidos e respetivos valores de C_T para a deteção do PCV2. CP-controlo positivo; CE – controlo endógeno; FAM – sonda para deteção de PCV2 (curva azul); HEX – sonda do controlo endógeno (curva verde).

Tal como aconteceu no PCR em tempo real para a deteção do PRRSV, tanto a amostra da *pool* de caudas de suínos (amostra 3333) como a amostra de pulmão de suíno (amostra 3336) apresentaram um resultado negativo para a presença do vírus PCV2, pois não se verificou nenhuma amplificação no canal FAM. Os controlos negativo e positivo encontram-se válidos.

Para além destas duas amostras, também se analisaram 2 *pools* de amostras de soros – designadas com os números 19470 e 19471 (cada *pool* continha quatro amostras individuais de soro que foram nomeadas do número 19458 até ao 19465) – quanto à presença deste circovírus e obteve-se os seguintes resultados apresentados na Figura 8.

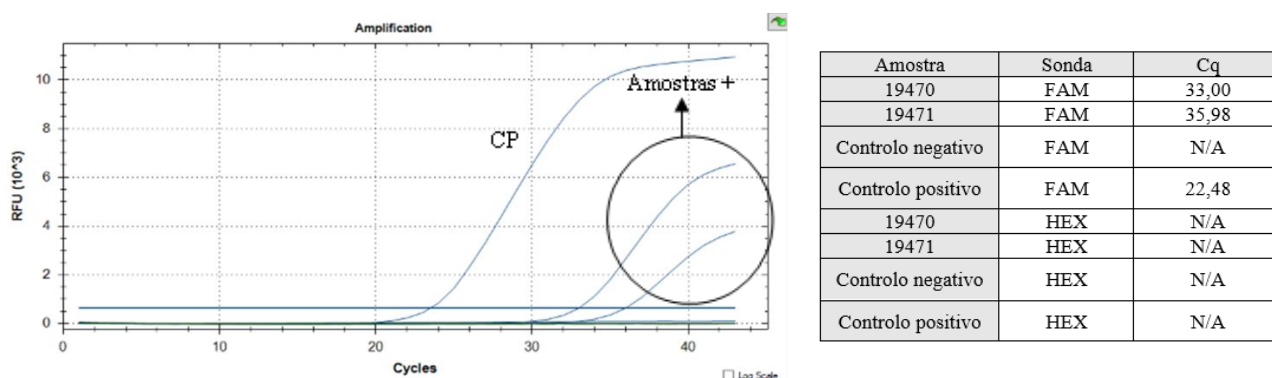
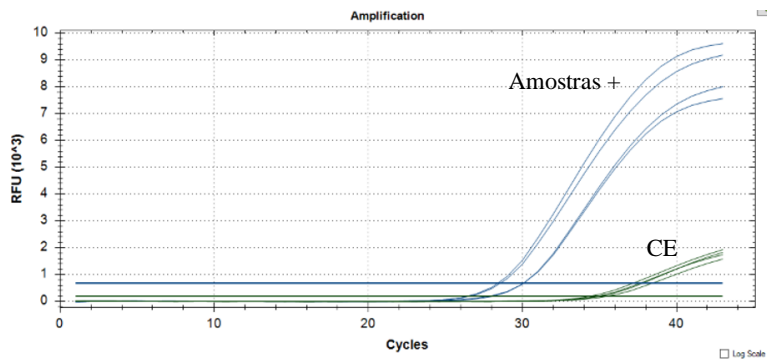


Figura 8. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respetivos valores de C_T para a deteção do PCV2. CP - controlo positivo; Amostras + - amostras positivas.

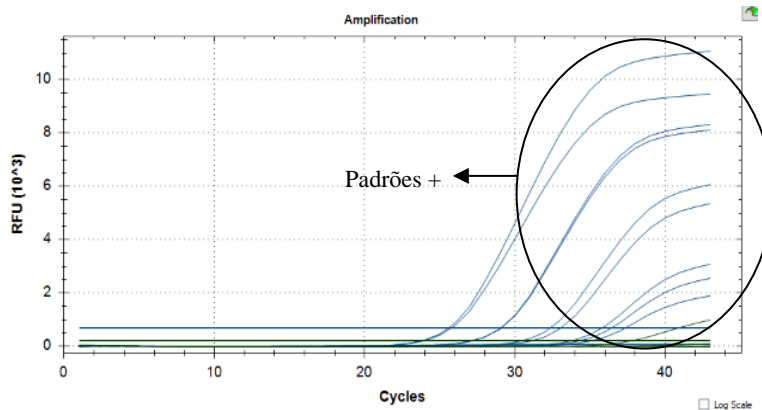
Analisando a Figura 8, verificou-se que apesar de ambas as amostras de soro serem positivas para a presença de PCV2 (canal FAM com amplificação), o controlo endógeno (canal HEX) não amplificou. Tal seria expectável caso o PCV2 fosse detetado com uma carga viral muito alta, ou seja, com um valor de C_T baixo, no entanto isso não se verificou. Deste modo, esta corrida de PCR foi repetida com duas réplicas para cada amostra, uma para o *pool* de amostras 19470 e outra para 19471 (Figura 9).



Amostra	Sonda	Cq
19470	FAM	28,41
19470 R	FAM	28,58
19471	FAM	30,09
19471 R	FAM	30,09
19470	HEX	35,07
19470 R	HEX	35,52
19471	HEX	34,96
19471 R	HEX	34,43

Figura 9. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respectivos valores de C_T para a detecção do PCV2. Amostras + - amostras positivas; CE – controle endógeno.

Por requerimento do cliente, caso uma *pool* de soros fosse positiva para a presença de PCV2 ter-se-ia que analisar as amostras de soro dessa *pool* individualmente, o que aconteceu neste caso para ambas as amostras (19470 e 19471). Assim foram analisadas 8 amostras designadas com os números de 19458 a 19465. Para a análise individual de amostras foi necessário preparar uma reta padrão usando o controle positivo fornecido pelo fabricante. Os resultados e gráfico de amplificação podem ser observados na Figura 10.



Amostra	[DNA]	Sonda	Cq
10 ¹	5,0 × 10 ⁴	FAM	25,78
10 ¹	5,0 × 10 ⁴	FAM	25,58
10 ²	5,0 × 10 ³	FAM	29,11
10 ²	5,0 × 10 ³	FAM	29,07
10 ³	5,0 × 10 ²	FAM	33,07
10 ³	5,0 × 10 ²	FAM	32,36
10 ⁴	5,0 × 10	FAM	36,44
10 ⁴	5,0 × 10	FAM	35,82
10 ⁵	5,0	FAM	37,37
10 ⁵	5,0	FAM	N/A
10 ⁶	0,5	FAM	N/A
10 ⁶	0,5	FAM	N/A
10 ¹	5,0 × 10 ⁴	HEX	N/A
10 ¹	5,0 × 10 ⁴	HEX	N/A
10 ²	5,0 × 10 ³	HEX	N/A
10 ²	5,0 × 10 ³	HEX	N/A
10 ³	5,0 × 10 ²	HEX	N/A
10 ³	5,0 × 10 ²	HEX	N/A
10 ⁴	5,0 × 10	HEX	N/A
10 ⁴	5,0 × 10	HEX	N/A
10 ⁵	5,0	HEX	N/A
10 ⁵	5,0	HEX	N/A
10 ⁶	0,5	HEX	N/A
10 ⁶	0,5	HEX	N/A

Figura 10. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real dos padrões e respectivos valores de C_T . Padrões + - amostras positivas dos padrões.

Com os valores de C_T obtidos para cada padrão, construiu-se uma reta dos C_T adquiridos em função do logaritmo do número de cópias de DNA por μL (concentração), obtendo-se o seguinte gráfico e equação da reta observado na Figura 11. A diluição 10^{-5} foi descartada, exceto uma das réplicas que apresentou valor de C_T .

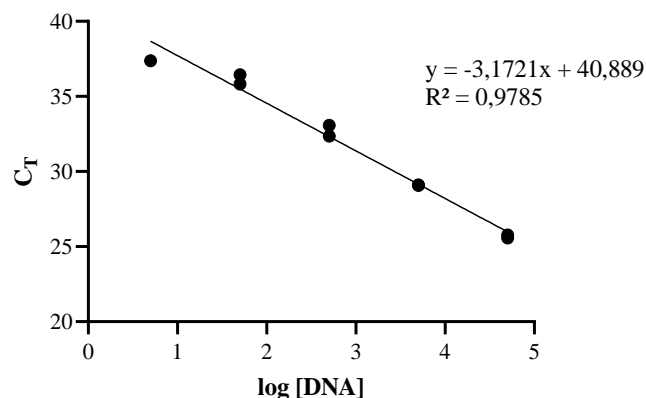


Figura 11. Gráfico do C_T em função do logaritmo da concentração de DNA e respectiva equação da reta.

Após a realização do PCR em tempo real das amostras de soro individual para a presença do PCV2, obtiveram-se os seguintes resultados apresentados na Figura 12.

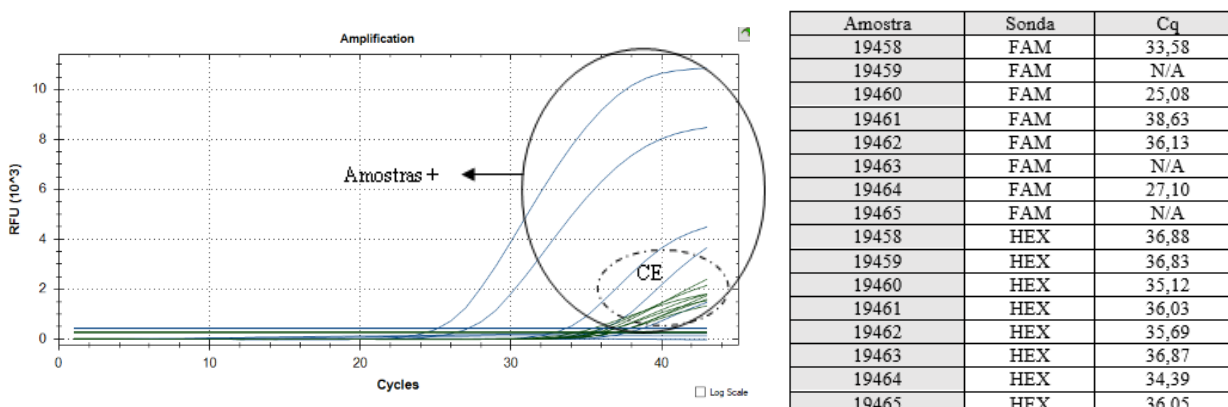


Figura 12. Gráfico de amplificação do PCR em tempo real das amostras de soros e respectivos valores de C_T para a detecção do PCV2. CE – controle endógeno (HEX, curva verde); Amostras + - amostras positivas (FAM, curva azul).

Através da equação da reta calculou-se a concentração de DNA de PCV2 presente em cada amostra e obteve-se os seguintes resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de DNA de PCV2 presente nas amostras de soros

Amostra	C _T	Log [DNA]	Quantidade de cópias de DNA de PCV2/ 5 µL
19458	34,35	2,06	115,19
19460	26,65	4,49	30819,42
19461	37,36	1,11	12,96
19462	35,83	1,59	39,34
19464	28,7	3,84	6959,29

Exemplo do cálculo da quantidade de cópias de DNA de PCV2/ 5 µL (amostra 19458):

$$y = -3,1721x + 40,889 \Leftrightarrow x = \frac{y - 40,889}{-3,1721} \Leftrightarrow x = \frac{34,35 - 40,889}{-3,1721} \Leftrightarrow x = \frac{-6,54}{-3,1721} \Leftrightarrow x = 2,06$$

Visto que $x = \log [\text{DNA}] \Leftrightarrow [\text{DNA}] = 10^x = 10^{2,06} = 115,19$ por 5 µL (volume colocado no tubo de PCR).

Analisando os resultados de quantificação de PCV2, verifica-se que a amostra com maior concentração do DNA viral é a amostra 19460, seguida das amostras 19464, 19458, 19462 e 19461. De frisar que estes resultados estão para 5 µL que foi a quantidade de amostra colocada no tubo de PCR, se quisermos quantificar a quantidade de DNA presente no soro inicial temos que calcular a quantidade de DNA de PCV2 para 100 µL, que corresponde ao volume inicial obtido.

Exemplo do cálculo para quantificar o DNA do PCV2 por 100 µL (amostra 19458):

$$\frac{115,19}{5 \mu\text{L}} \times \frac{100 \mu\text{L}}{x} = 2303,8 \text{ cópias de DNA de PCV2}$$

Num estudo conduzido por Calsamiglia *et al.* 2002 [157], foram analisadas amostras de soros e de tecidos de suínos com e sem PMWS em relação à presença de PCV1 e PCV2 por dois métodos, hibridização *in situ* e PCR, em paralelo com análises histopatológicas. Observando os resultados, verificou-se que a PCR era mais eficaz em comparação à técnica de hibridização *in situ* na detecção do PCV2, mas que a técnica de hibridização era mais exata para a detecção de PMWS. Assim a técnica de PCR deteta a presença de PCV2 num estado mais inicial da infecção. Neste estudo também se visualizou

que as amostras de órgãos linfóides são mais eficazes na detecção de PCV2 em comparação com as amostras de soro. Apesar dessa evidência, como a diferença entre as duas matrizes não foi muito elevada e tendo em conta que para analisar os tecidos do nódulo linfático tem que se matar o animal contrariamente às amostras de soro, considera-se estas últimas mais vantajosas para a análise de PMWS caso o animal não esteja morto.

No entanto, este problema pode ser facilmente revertido se em vez de analisarmos os tecidos dos nódulos linfáticos, analisarmos os fluidos orais desses tecidos tal como realizado no estudo de Plut *et al.* 2020 [29]. Assim, o suicultor não tem necessidade de matar o animal e consegue detetar o patogénico num estado mais inicial de infeção, permitindo iniciar um combate contra este patogénico mais cedo e diminuir a sua propagação para outros suínos não infetados.

Assim, apesar de não podermos comparar os nossos resultados de PCR em tempo real, analisando estes estudos, concluímos que os soros são uma matriz mais vantajosa para analisar que as amostras de órgãos/tecidos. O soro é mais vantajoso do que a amostra de pulmão porque não requer que o animal esteja ou seja morto para a análise e mais vantajosa que as caudas pois estas não são um local de replicação alvo deste patogénico [50]. Deste modo, é provável que a detecção deste patogénico em amostras de caudas de suínos seja menos eficaz em comparação com amostras de soro, cuja concentração de PCV2 deverá ser superior por ser a via pelo qual o PCV2 se dissemina pelo organismo do animal [50].

Relativamente à preservação das amostras não repetimos a análise das amostras positivas passado determinado período e por isso não podemos aferir se haveria alterações significativas na mesma. No entanto, analisando a literatura observámos que num estudo de Weissenbacher-Lang *et al.* 2020 [158], sequências de PCV2 foram analisadas por 16 anos consecutivos. Neste, amostras de nódulos linfáticos (N=158), amostras de rins (N=2) e amostra de intestino (N=1) foram fixadas em formalina e embebidos em parafina (FFPE, do inglês *formalin-fixed and paraffin-embedded*) e sequenciada a ORF2 que codifica para a proteína do capsídeo do PCV2 através da sequenciação de *Sanger* entre 2002 a 2017. Após a análise dos resultados, verificou-se que o tempo de armazenamento das amostras a uma temperatura de -20°C não teve uma influência negativa no sucesso e na qualidade de sequenciação, o que nem sempre se verifica em todos os métodos usados, como é o caso do método de imuno-histoquímica [158]. Em relação ao método de PCR em tempo real, tal como neste estudo, a literatura remete que a sequência amplificada corresponde

normalmente à ORF2 [37], [159], [160]. Assim, visto tanto a sequenciação de Sanger como o qPCR serem métodos moleculares com o mesmo alvo, esperamos que não existam diferenças significativas na detecção do PCV2 pelo PCR em tempo real ao longo do tempo se armazenarmos as amostras de tecidos em FFPE a -20°C.

4.3 Pesquisa de *Leptospira* spp. patogénicas em amostras de órgãos/tecidos e zaragatoas

Para a deteção de *Leptospira* spp., foram realizados dois ensaios. Num primeiro ensaio analisou-se as amostras de suínos, de cauda (*pool*) e a amostra de pulmão, designadas por 3333 e 3336, respetivamente. No segundo ensaio duas amostras de secreções traqueais colhidas em zaragatoas de aves designadas por 6562 e 6565 foram a matriz alvo de deteção destas bactérias. Todas as amostras apresentaram resultados negativos para a presença destas bactérias (não havendo amplificação no canal FAM) como se pode observar na Figura 13.

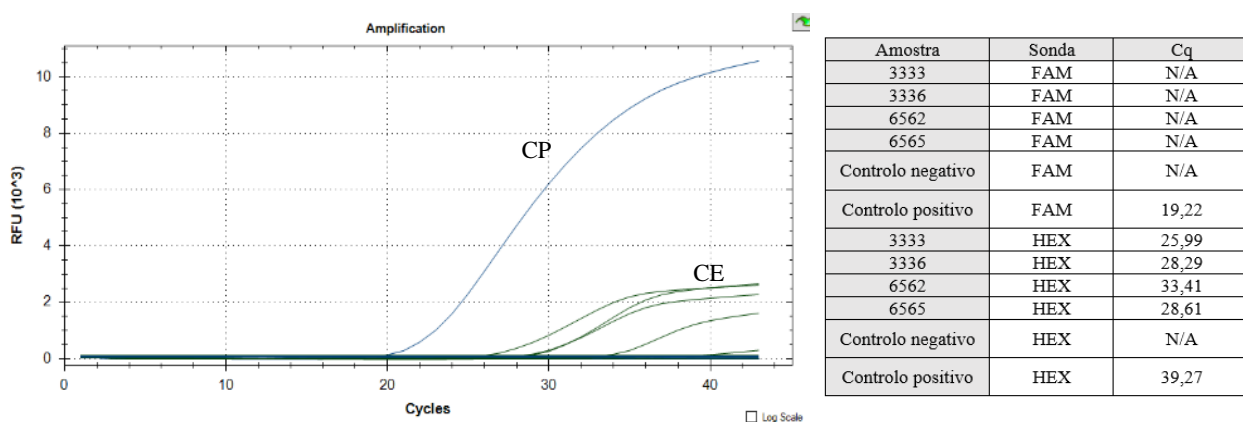


Figura 13. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras de órgãos/tecidos e respetivos valores de C_T para a deteção de *Leptospira*. CP – controlo positivo; CE – controlo endógeno; FAM – sonda para identificação de *Leptospira* (curva azul); HEX – sonda do controlo endógeno (curva verde).

Visualizando os resultados obtidos na Figura 13 podemos concluir que estes são válidos segundo os parâmetros indicados pelo fornecedor (Tabela A3 em anexo) e que, apesar de não estar referido no *kit*, o controlo negativo não amplifica para o controlo endógeno tal como acontece no *kit* usado para o PCV2. De realçar que o *kit* para deteção de *Leptospira* e de PCV2 são do mesmo fornecedor.

Na realidade, apesar de os resultados estarem de acordo com os requisitos do fabricante do *kit*, amostras de cauda de suínos e amostras de pulmão não são normalmente analisadas para pesquisa da presença de *Leptospira* e até à data apenas num estudo de Zilber et al. 2016 [161] foram analisadas para deteção de *Leptospira*, amostras de pulmões de rato. Com efeito, os tipos de amostras mais comuns de serem analisadas são amostras de soro, amostras de rins, de fígados [71] e amostras de órgãos reprodutores

e de fetos [150]. Assim, não há evidências suficientes na literatura que apoiem a presença desta bactéria em quantidades suficientes neste tipo de amostras que permitissem a sua detecção, levando-nos a concluir que mesmo que o animal apresentasse *Leptospira* spp., poderiam não ser detetadas nos tecidos/órgãos analisados e que em futuras análises o uso deste tipo de amostras não é o aconselhável. Assim, as amostras mais aconselháveis para a detecção destas bactérias são amostras do sistema urogenital e amostras de sangue.

Antes de se analisar uma amostra de um suíno para detecção de *Leptospira*, deve-se verificar se o animal demonstra sintomas associados a problemas reprodutores. As amostras dos órgãos reprodutores (por exemplo: amostras endocervicais) ou amostras de fetos natimortos são preferíveis em comparação a amostras de urina, rins, baço e fígados [162]. Como exemplo pode-se referir o estudo [163] em que de 24 vacas leiteiras com problemas reprodutores apenas uma amostra de urina detetou a presença de *Leptospira* pelo método de PCR, enquanto que pelo uso de amostras de corrimento vaginal, foram detetadas oito vacas positivas para a presença desta bactéria pelo mesmo método.

Segundo a informação do fornecedor sobre a conservação de amostras, consoante o tipo de amostra, diferentes métodos de conservação são adotados. Se as amostras forem de sangue ou soro, deve-se manter as amostras refrigeradas, caso estas sejam analisadas até 24 horas depois da colheita e congeladas se a análise for realizada passado mais de 24 horas depois de serem colhidas, tendo em atenção que o soro nunca deve ser congelado com coágulos presentes. Se as amostras forem de órgãos/tecidos ou zaragatoas esfregadas em secreções traqueobrônquicas a amostra deve ser refrigerada se analisada num espaço de tempo de 24 horas após colheita e congelada se a análise for realizada após as 24 horas. Neste caso, se forem utilizados estudos histopatológicos deve-se retirar uma pequena porção da amostra de órgão/tecido antes de a congelar e armazená-la no frigorífico (refrigerada).

Relativamente à nossa análise, os órgãos/tecidos rececionados no dia 22 de Janeiro de 2021 foram congelados a -20°C e analisados para a presença desta bactéria após 48h. As zaragatoas esfregadas em secreções traqueobrônquicas foram analisadas entre 24h após a sua receção e armazenadas a 4°C até à sua análise. Deste modo, segundo a informação facultada pelo fabricante, a temperatura armazenada foi a indicada para o tempo de análise adotado.

4.4 Identificação de fatores de virulência da *E. coli* presente em amostras de fezes

No que diz respeito aos fatores de virulência da *E. coli*, analisou-se *E. coli* presentes em amostras de fezes de suínos. Neste caso para analisarmos os resultados, observámos as curvas de fusão e respetiva temperatura de *melting*. Foram analisados 2 fatores de virulência relacionados com a adesão (F4 e F18), comumente encontrados em *E. coli* patogénicas relacionadas com doenças em suínos. As temperaturas de *melting* [°C] são 83°C e 86°C, para F4 e F18, respetivamente.

As curvas de fusão observadas são apresentadas nas Figuras 14 (F4) e 15 (F18).

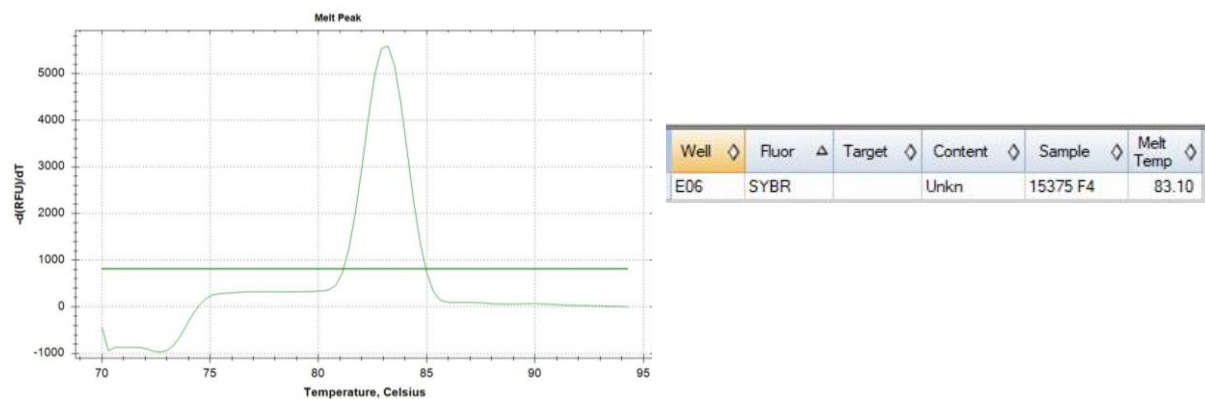


Figura 14. Curva de fusão por PCR em tempo real de uma amostra de fezes para a deteção do alvo F4.

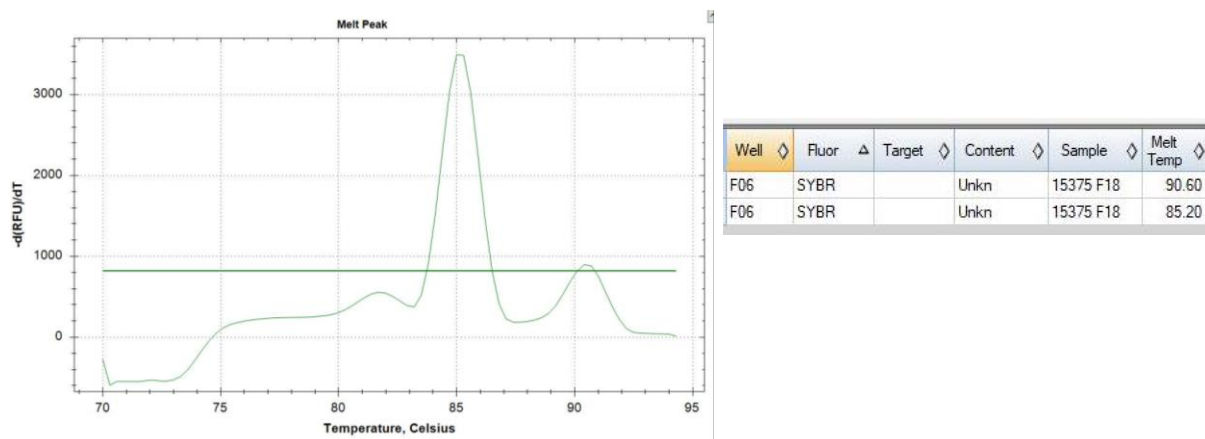


Figura 15. Curva de fusão por PCR em tempo real de uma amostra de fezes para a deteção do alvo F18.

Assim, observando ambos os gráficos, pode-se concluir que foi possível detetar na amostra analisada ambos os genes de fimbrias, F4 e F18, associados à virulência da *E. coli*.

No entanto, apesar de sabermos que estes fatores estão associados à virulência das ETEC, com esta análise não conseguimos saber a estirpe específica. Para isso seria necessário aplicar outras metodologias que passariam pelo isolamento da estirpe de *E. coli* para posterior análise por exemplo com base na sequenciação de genoma tal como no estudo [90], para determinar por exemplo filogrupos e inferir quanto à sua patogenicidade.

Com efeito nesse estudo [90], após o isolamento de colónias de *E. coli* de diarreia de suínos, fez-se a extração de DNA e sequenciou-se o seu genoma completo por WGS. Analisando os resultados obtidos observou-se que das 90 estirpes de ETEC quantificadas, 69 continham a adesina fimbrial F4 e 21 continham a adesina fimbrial F18, com ambas estas adesinas a corresponderem à variante c (F4c e F18c). O serogrupo prevalente nas adesinas fimbriais correspondeu ao serogrupo O149 para a F4 (72,5%) e o serogrupo O8 para a F18 (33,3%). Ambos estes serogrupos foram já associados a PWD nos leitões [90].

Efetivamente ambas estas fimbrias (F4 e F18) encontram-se associados à diarreia pós-desmame, sendo por isso frequentemente pesquisadas. Num estudo conduzido por Ikwap *et al.* 2016 [164] amostras de zaragatoas esfregadas no reto de 83 leitões, ainda amamentados ou desmamados até duas semanas, foram analisadas para a presença de, entre outros fatores de virulência, as fimbrias F4 e F18. Dessas amostras de zaragatoas 32 provinham de leitões que apresentavam diarreia e 51 de leitões que não apresentavam diarreia. Após a análise, verificou-se que a F4 foi a fimbria predominante, a ser detetada em 8,4% dos 83 leitões com 12,5% a ser detetado nos leitões que apresentavam diarreia e 5,8% a ser detetada em leitões que não sofriam de diarreia. A fimbria F18 não foi detetada em nenhuma amostra retal dos 83 leitões analisados. A análise das estirpes de ETEC pela serotipagem clássica demonstraram que a fimbria F4 foi detetada em estirpes com o antigénio O138, já associado à PWD nos leitões.

Noutro estudo conduzido por Zhang *et al.* 2007 [107] 304 estirpes isoladas de amostras de fezes, amostras de zaragatoas fecais ou amostras de intestinos de porcos jovens foram analisadas em relação à sua presença de genes fimbriais e a presença de genes de enterotoxinas entre as quais a STa, a STb, a LT e a EAST1 por PCR *multiplex* tradicional. Dessas 304 estirpes, 175 deram positivas para a presença de genes de fimbrias. Das estirpes que deram positivas 98,9% demonstraram amplificação do gene

das fimbrias ou F4 ou F18, com 64,6% a corresponderem à F4 e 34,3% a corresponder à F18. Em relação à fimbria F4 também se verificou que 42,5% dessas estirpes continham os genes associados às toxinas LT e STb e que 23,9% continham os genes das toxinas LT, STb e EAST1. Relativamente à F18, dos 60 isolados positivos para genes de toxinas, 31,7% tinham as seguintes enterotoxinas em conjunto a STb, a STa e a Sxt2e. Assim, neste estudo observou-se que as ETEC dominantes que causaram PWD nos suínos foram as que expressaram a fimbria F4 e as enterotoxinas LT/STb ou LT/STb/EAST1 ou as que expressaram a fimbria F18 e as enterotoxinas STa/STb/Sxt2e.

4.5 Identificação de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em secreções traqueais de aves

As amostras analisadas por PCR em tempo real para a presença de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e de *Mycoplasma synoviae* (MS) consistiram em *pools* de zaragatoas esfregadas em secreções traqueais de aves. Neste caso, para a amostra da secreção traqueal, recolhida com zaragatoa, ser considerada positiva para o *M. gallisepticum* tem que existir amplificação no canal FAM que deteta a presença do gene *mgc2*, no caso do *M. synoviae* a amostra tem que mostrar amplificação no canal HEX que deteta o gene *vlhA*. Os resultados são considerados válidos segundo indicações do fornecedor (Tabela A5 em anexo) se o controlo positivo amplificar para a presença de ambas as estirpes e se o controlo negativo não apresentar nenhuma amplificação nos canais FAM e HEX, mas apresentar amplificação para o canal Cy5 (controlo endógeno). No total 13 *pools* de zaragatoas esfregadas em amostras traqueais (N=4 a 6) de galinhas poedeiras com idades compreendidas entre 8 a 10 semanas foram analisadas.

Obtiveram-se resultados distintos das *pools* de amostras de zaragatoas. Houve resultados onde não se detetou nenhum dos patogénicos (Figura 16 – amostra 16906), resultados onde detetou-se apenas a presença de DNA de MG (Figura 17 – amostra 25058) ou de MS (Figura 18 – amostras 20969 e 20970) e resultados onde existiu amplificação de DNA para as duas espécies de *Mycoplasma* analisadas (Figura 19 – amostra 15260).

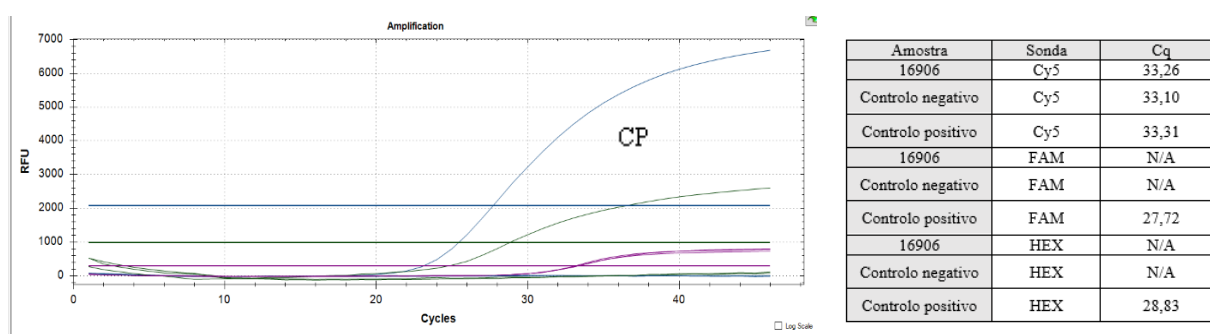
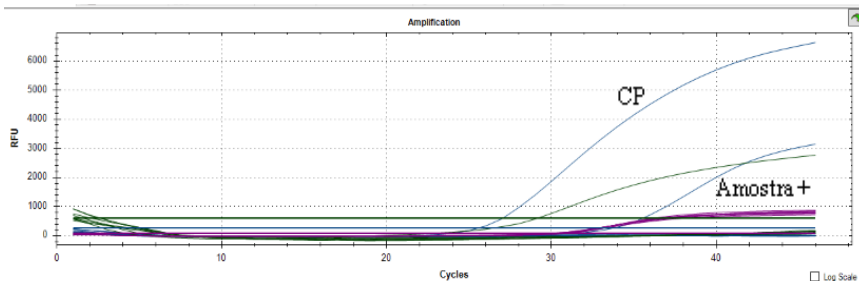
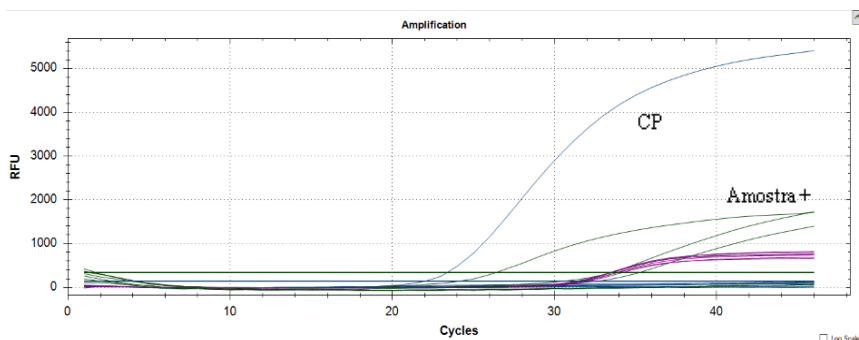


Figura 16. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real de uma amostra de zaragatoas da traqueia (*pool*) e respetivo valor de C_T para a deteção de *Mycoplasma*. Amostra negativa para a deteção do MG e MS. CP – controlo positivo.



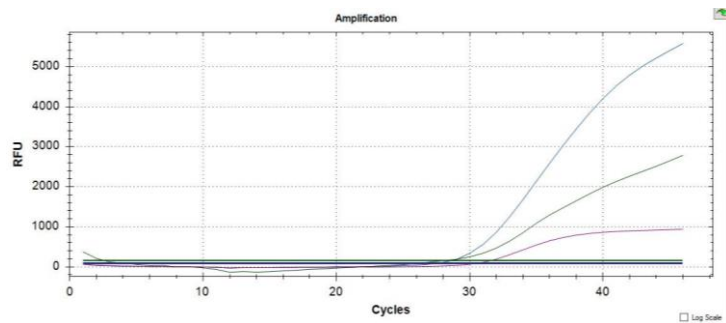
Amostra	Sonda	Cq
25058	Cy5	30,91
25079	Cy5	30,57
25080	Cy5	30,40
25108	Cy5	31,02
25109	Cy5	29,84
25110	Cy5	30,73
Controlo negativo	Cy5	30,64
Controlo positivo	Cy5	30,08
25058	FAM	33,78
25079	FAM	N/A
25080	FAM	N/A
25108	FAM	N/A
25109	FAM	N/A
25110	FAM	N/A
Controlo negativo	FAM	N/A
Controlo positivo	FAM	25,56
25058	HEX	N/A
25079	HEX	N/A
25080	HEX	N/A
25108	HEX	N/A
25109	HEX	N/A
25110	HEX	N/A
Controlo negativo	HEX	N/A
Controlo positivo	HEX	29,22

Figura 17. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras zaragoatoas de traqueias (*pools*) e respectivos valores de C_T para a detecção de *Mycoplasma*. Amostra positiva para a detecção do MG. CP – controlo positivo; Amostra + - amostra positiva; FAM – sonda de identificação do *M. gallisepticum* (curva azul); HEX – sonda de identificação do *M. synoviae* (curva verde); Cy5 – Sonda do controlo endógeno (curva rosa)



Amostra	Sonda	Cq
20969	Cy5	31,57
20970	Cy5	31,32
20971	Cy5	31,42
20972	Cy5	31,39
20933	Cy5	31,76
Controlo negativo	Cy5	31,95
Controlo positivo	Cy5	31,28
20969	FAM	N/A
20970	FAM	N/A
20971	FAM	N/A
20972	FAM	N/A
20933	FAM	N/A
Controlo negativo	FAM	N/A
Controlo positivo	FAM	21,94
20969	HEX	35,18
20970	HEX	33,44
20971	HEX	N/A
20972	HEX	N/A
20933	HEX	N/A
Controlo negativo	HEX	N/A
Controlo positivo	HEX	26,33

Figura 18. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real das amostras zaragoatoas de traqueias (*pools*) e respectivos valores de C_T para a detecção de *Mycoplasma*. Amostras positivas para a detecção do MS. CP – controlo positivo; Amostra + - amostra positiva.



Amostra	Sonda	Cq
15260	Cy5	30,45
15260	FAM	27,52
15260	HEX	27,89

Figura 19. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real de uma amostra de zaragatoa de traqueia (*pool* de 10) e respetivo valor de C_T para a deteção de *Mycoplasma*. Amostra positiva para a deteção do MG e MS.

Neste ensaio analisou-se um único tipo de amostra para a deteção de MG e MS, que foram neste caso as zaragatoas esfregadas na zona das vias respiratórias de aves, mais concretamente na tranqueia. No entanto, estas são frequentemente um tipo de amostra usado em vários estudos para analisar a presença destas bactérias nas aves, visto ser uma das principais zonas alvo deste patogénico [111].

Num estudo conduzido por Ball *et al.* 2020 [165], foram analisadas amostras de zaragatoas de pontas de algodão com diferentes hastes (de madeira e de plástico). Para além disso, verificaram diferenças significativas nos resultados considerando a temperatura de armazenamento da amostra.

Observaram então que zaragatoas com haste de plástico permitem uma melhor deteção de MG e MS por PCR em tempo real em comparação com as zaragatoas com haste de madeira. Para além disso, observaram que após 2-3 dias de armazenamento o sinal era positivo para amostras em zaragatoa de plástico armazenadas a 4°C, não acontecendo o mesmo para amostras armazenadas à temperatura ambiente.

Em relação às nossas amostras de secreções traqueais estas foram recolhidas numa zaragatoa de algodão com haste de metal e armazenadas a 4°C até a sua análise, sendo estas analisadas entre 24-72 horas após a colheita no animal.

Num outro estudo realizado por Michiels *et al* 2016 [166] foram analisadas amostras de sangue de galinhas poedeiras por, em primeiro lugar, pela técnica de RPA para a presença de *Mycoplasma gallisepticum*. Caso a amostra desse positiva para a presença do MG esta era novamente testada pelo método de ELISA. Para além desta pesquisa, este estudo também analisou 12 zaragatoas esfregadas na zona traqueal de frangos para a presença de MG e MS por PCR em tempo real. A razão pelo qual foram usados métodos serológicos e o método molecular consoante a idade da galinha prende-se pelo facto que o surgimento de anticorpos no animal após este ser infetado por

o *Mycoplasma* demora algumas semanas. Tendo em conta que os frangos são abatidos entre 6 a 7 semanas de idade, estes poderiam ter o DNA desta bactéria mas ainda não se encontrarem seropositivos o que levaria a resultados falsos-negativos. Analisando os resultados verificou-se que 0,9% de amostras de sangue de galinhas poedeiras deram positivo para a presença do MG após a análise com o método de ELISA e que nos frangos 2,7% das amostras recolhidas na zaragatoa deram positivas para a presença de MG e 12,9% deram positivas para a presença de MS por PCR em tempo real. Neste caso, a infeção por MS nos frangos era superior à infeção pelo MG.

Relativamente aos nossos resultados tendo em conta que as amostras analisadas eram provenientes de galinhas poedeiras com idades compreendidas entre as 8 e as 10 semanas, o uso do PCR em tempo real foi um método adequado em comparação com um possível uso da técnica de ELISA. Como tal, também a utilização de amostras traqueais recolhidas na zaragatoa ao invés de amostras sanguíneas torna-se mais aconselhável, visto esta bactéria infetar as vias respiratórias [111].

V. Conclusões

O diagnóstico baseado em metodologias que permitem a deteção rápida de agentes patogénicos em amostras provenientes de ambientes de produção animal intensiva, podem representar a diminuição de perdas na produção e redução de custos neste sector. Assim, com este estudo pretendia-se avaliar metodologias baseadas em PCR para a deteção rápida de alguns agentes patogénicos associados a doenças em animais de produção intensiva nomeadamente em suínos e aves.

Foi assim demonstrado com este trabalho que as amostras de soro são adequadas para a deteção de PRRSV, sendo que com esta metodologia foi possível diferenciar as duas variantes, europeia e americana. A deteção e quantificação de PCV2 em amostras de soro também se revelou adequada. No entanto, para o diagnóstico de PCVAD, amostras de tecidos/órgãos deverão também ser analisadas em paralelo.

Também se concluiu que as amostras de órgãos/tecidos e amostras de fluidos orais não são as mais indicadas para detetar *Leptospira* patogénicas e que amostras do trato urogenital são mais apropriadas. Em relação à deteção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* pelo método de PCR em tempo real concluímos que amostras de fluidos orais são eficazes para detetar estes patogénicos.

Por último, relativamente aos fatores de virulência da *E. coli*, especificamente as adesinas F4 e F18 concluímos que as amostras de fezes são adequadas para a análise pela técnica de PCR em tempo real.

VI. Perspetivas Futuras

Como perspetivas futuras a implementar no laboratório podemos referir a deteção de PCV2 e *Leptospira* patogénicas pela técnica de ELISA, após um resultado negativo pela técnica de PCR em tempo real, de modo a inferir se o animal já tinha estado infetado noutra momento precedente à análise (presença de anticorpos). Deste modo, mesmo que o animal não apresentasse a deteção do patogénico por PCR em tempo real, caso fosse seropositivo, alertar-se-ia o cliente que existia o risco de uma possível infeção estar a desenvolver-se em outros animais não analisados, mesmo que estes não apresentassem sintomas clínicos.

Em relação à detecção da *Leptospira* patogénica métodos serológicos como o MAT poderiam ser usados para identificar o serogrupo da bactéria como complemento ao uso de PCR em tempo real.

VII. Bibliografia

- [1] M. J. Blackwell and R. L. Leap, “Veterinary medicine is public health,” *J. Vet. Med. Educ.*, vol. 35, no. 2, pp. 148–149, 2008, doi: 10.3138/jvme.35.2.148.
- [2] E. Ganivet, “Growth in human population and consumption both need to be addressed to reach an ecologically sustainable future,” *Environ. Dev. Sustain.*, vol. 22, no. 6, pp. 4979–4998, 2020, doi: 10.1007/s10668-019-00446-w.
- [3] A. R. Linnemann, M. Benner, R. Verkerk and M. A. J. S. Van Boekel, “Consumer-driven food product development,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 17, no. 4, pp. 184–190, 2006, doi: 10.1016/j.tifs.2005.11.015.
- [4] R. E. Baynes and J. E. Riviere, “Importance of Veterinary Drug Residues,” *Strateg. Reducing Drug Chem. Residues Food Anim.*, vol. 9780470247, pp. 1–8, 2014, doi: 10.1002/9781118872819.ch1.
- [5] M. C. Hikke and G. P. Pijlman, “Veterinary Replicon Vaccines,” *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, vol. 5, no. November, pp. 89–109, 2017, doi: 10.1146/annurev-animal-031716-032328.
- [6] “Portal do INE.” https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000211&contexto=bd&selTab=tab2 (accessed Oct. 24, 2021).
- [7] K. Keffaber, “Reproductive failure of unknown etiology,” *Am. Assoc. Swine Pract. Newslett.*, vol. 1, pp. 1–9, 1989.
- [8] T. Loula, “Mystery Pig-Disease,” *AGRI-PRACTICE*, vol. 12, no. 1, pp. 23–34, 1991.
- [9] D. Holtkamp, J. B. Kliebenstein, E. Neumann, J. Zimmerman, H. Rotto, T. Yoder, C. Wang, P. Yeske, C. Mowrer and C. Haley, “Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers,” *J. Swine Heal. Prod.*, vol. 21, no. 2, pp. 72–84, 2013.
- [10] D. Cavanagh, “Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae,” *Arch. Virol.*, vol. 142, no. 3, pp. 629–633, 1997.
- [11] R. Allende, T. L. Lewis, Z. Lu, D. L. Rock, G. F. Kutish, A. Ali, A. R. Doster and F. A. Osorio, “North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions,” *J. Gen. Virol.*, vol. 80, no. 2, pp. 307–315, 1999, doi: 10.1099/0022-1317-80-2-307.
- [12] E. J. Snijder, H. van Tol, K. W. Pedersen, M. J. B. Raamsman and A. A. F. de Vries, “Identification of a Novel Structural Protein of Arteriviruses,” *J. Virol.*, vol.

73, no. 8, pp. 6335–6345, 1999, doi: 10.1128/jvi.73.8.6335-6345.1999.

- [13] A. E. Firth, J. C. Zevenhoven-Dobbe, N. M. Wills, Y. Y. Go, U. B. R. Balasuriya, J. F. Atkins, E. J. Snijder and C. C. Posthuma, “Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the gp5 coding sequence and is important for virus production,” *J. Gen. Virol.*, vol. 92, no. 5, pp. 1097–1106, 2011, doi: 10.1099/vir.0.029264-0.
- [14] G. Dai, M. Huang, T. S. Fung and D. X. Liu, “Research progress in the development of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a viral vector for foreign gene expression and delivery,” *Expert Rev. Vaccines*, vol. 19, no. 11, pp. 1041–1051, 2020, doi: 10.1080/14760584.2020.1857737.
- [15] X. J. Meng, “Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Implications for current vaccine efficacy and future vaccine development,” *Vet. Microbiol.*, vol. 74, no. 4, pp. 309–329, 2000, doi: 10.1016/S0378-1135(00)00196-6.
- [16] J. K. Lunney, Y. Fang, A. Ladinig, N. Chen, Y. Li, B. Rowland and G. J. Renukaradhya, “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system,” *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, vol. 4, pp. 129–154, 2016, doi: 10.1146/annurev-animal-022114-111025.
- [17] R. J. Chand, B. R. Tribble and R. R. R. Rowland, “Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus,” *Curr. Opin. Virol.*, vol. 2, no. 3, pp. 256–263, 2012, doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.002.
- [18] R. R. R. Rowland, S. Lawson, K. Rossow and D. A. Benfield, “Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero,” *Vet. Microbiol.*, vol. 96, no. 3, pp. 219–235, 2003, doi: 10.1016/j.vetmic.2003.07.006.
- [19] C. C. Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Rossow, K.D., Shivers, J.L., Yaeger, M.J., Chase and D. A. Garduno, R.A., Collins, J.E., Benfield, “Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Semen and Tissues from Vasectomized and Nonvasectomized Boars,” *Vet Pathol*, pp. 260–267, 1998.
- [20] R. W. Wills, A. R. Doster, J. A. Galeota, J. H. Sur and F. A. Osorio, “Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 58–62, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.1.58-62.2003.
- [21] G. Wensvoort, C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluiver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten and F. Wagenaar, “Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus,” *Vet. Q.*, vol. 13, no. 3, pp. 121–130, 1991, doi: 10.1080/01652176.1991.9694296.
- [22] E. L. Thacker, P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech and B. J. Thacker, “Mycoplasma hyopneumoniae Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia,” vol. 37, no. 3, pp. 620–627, 1999.

- [23] G. M. Allan, F. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, J. Ellis and S. Krakowka, "Immunostimulation, PCV-2 and PMWS.," *The Veterinary record*, vol. 147, no. 6. England, pp. 170–171, Aug. 2000.
- [24] K. Van Reeth, H. Nauwynck and M. Pensaert, "Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: A clinical and virological study," *Vet. Microbiol.*, vol. 48, no. 3–4, pp. 325–335, 1996, doi: 10.1016/0378-1135(95)00145-X.
- [25] C. Terpstra and G. Wensvoort, "Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad vims : Koch ' s postulates fulfilled," no. May 2015, pp. 37–41, doi: 10.1080/01652176.1991.9694297.
- [26] W. A. López, J. J. Zimmerman, P. C. Gauger, K. M. Harmon, L. Bradner, M. Zhang, L. Giménez-Lirola, A. Ramirez, J. P. Cano and D. C. L. Linhares, "Practical aspects of PRRSV RNA detection in processing fluids collected in commercial swine farms," *Prev. Vet. Med.*, vol. 180, no. January, 2020, doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105021.
- [27] B. J. Pepin, A. Kittawornrat, F. Liu, P. C. Gauger, K. Harmon, S. Abate, R. Main, C. Garton, J. Hargrove, C. Rademacher, A. Ramirez and J. Zimmerman, "Comparison of specimens for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boar studs," *Transbound. Emerg. Dis.*, vol. 62, no. 3, pp. 295–304, 2015, doi: 10.1111/tbed.12135.
- [28] Xiangjin Yan, J. Zeng, X. Li, Z. Zhang, A. U. Din, K. Zhao and Y. Zhou, "High incidence and characteristic of PRRSV and resistant bacterial Co-Infection in pig farms," *Microb. Pathog.*, vol. 149, no. September, p. 104536, 2020, doi: 10.1016/j.micpath.2020.104536.
- [29] J. Plut, U. Jamnikar-Ciglenecki and M. Stukelj, "Molecular detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus 2 and hepatitis e virus in oral fluid compared to their detection in faeces and serum," *BMC Vet. Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1186/s12917-020-02378-4.
- [30] S. Payne, "Other Small DNA Viruses," *Viruses*, pp. 243–246, 2017, doi: 10.1016/b978-0-12-803109-4.00030-1.
- [31] X. J. Meng, "Circoviridae," *Fields Virol. Sixth Ed.*, vol. 1, pp. 343–349, 2013, doi: 10.1016/b978-012511340-3/50022-2.
- [32] H. B. Gelberg, *Alimentary System and the Peritoneum, Omentum, Mesentery, and Peritoneal Cavity*, Sixth Edit. Elsevier Inc., 2017. doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00007-2.
- [33] I. Tischer, R. Rasch and G. Tochtermann, "Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines.," *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infekt. und Hyg. Erste Abteilung Orig. R. A Medizinische Mikrobiol. und Parasitol.*, vol. 226, no. 2, pp. 153–167, Feb. 1974.

- [34] I. Tischer, W. Mielsds, D. Wolff, M. Vagt and W. Griem, "Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus," *Arch. Virol.*, vol. 91, no. 3–4, pp. 271–276, 1986, doi: 10.1007/BF01314286.
- [35] J. Ellis, L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd and D. Haines, "Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome," *Can. Vet. J.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–51, 1998.
- [36] S. Bin Shang, Y. F. Li, J. Q. Guo, Z. T. Wang, Q. X. Chen, H. G. Shen and J. Y. Zhou, "Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2," *Res. Vet. Sci.*, vol. 84, no. 1, pp. 150–157, 2008, doi: 10.1016/j.rvsc.2007.02.007.
- [37] Y. Wang, L. Noll, E. Porter, C. Stoy, J. Dong, J. Anderson, J. Fu, R. Pogranichniy, J. Woodworth, L. Peddireddi and J. Bai, "Development of a differential multiplex real-time PCR assay for porcine circovirus type 2 (PCV2) genotypes PCV2a, PCV2b and PCV2d," *J. Virol. Methods*, no. 10, 2020.
- [38] X. J. Meng, "Porcine circovirus type 2 (PCV2): Pathogenesis and interaction with the immune system," *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, vol. 1, pp. 43–64, 2013, doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103720.
- [39] A. L. Hamel, L. L. Lin and G. P. S. Nayar, "Nucleotide Sequence of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs," *J. Virol.*, vol. 72, no. 6, pp. 5262–5267, 1998, doi: 10.1128/jvi.72.6.5262-5267.1998.
- [40] F. McNeilly, I. McNair, D. P. Mackie, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. Moffett, J. Ellis, S. Krakowka and G. M. Allan, "Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2," *Arch. Virol.*, vol. 146, no. 5, pp. 909–922, 2001, doi: 10.1007/s007050170124.
- [41] F. Faurez, D. Dory, B. Grasland and A. Jestin, "Replication of porcine circoviruses," *Virol. J.*, vol. 6, no. June, 2009, doi: 10.1186/1743-422X-6-60.
- [42] K. L. Helke, P. C. Ezell, R. Duran-Struuck and M. M. Swindle, *Biology and Diseases of Swine*, Third Edit. Elsevier Inc., 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00016-X.
- [43] A. Mankertz, "Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host," *Virus Res.*, vol. 164, no. 1–2, pp. 54–60, 2012, doi: 10.1016/j.virusres.2011.11.001.
- [44] N. Rose, T. Opriessnig, B. Grasland and A. Jestin, "Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2)," *Virus Res.*, vol. 164, no. 1–2, pp. 78–89, 2012, doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.002.
- [45] J. C. S. Harding, E. T. G. Clark, J. H. Strokappe, P. I. Willson and J. A. Ellis, "Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation Materials and methods Results," vol. 6, no. 6, pp. 249–254, 1998.

- [46] G. M. Allan, E. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, D. Moffett, F. Malone, J. Ellis and S. Krakowka, "PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome.," *The Veterinary record*, vol. 146, no. 24. England, pp. 711–712, Jun. 2000.
- [47] J. Kim, H. Chung and C. Chae, "Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex," vol. 166, pp. 251–256, 2003, doi: 10.1016/S1090-0233(02)00257-5.
- [48] R. E. Sanchez, H. J. Nauwynck, F. Mcneilly, G. M. Allan and M. B. Pensaert, "Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation," vol. 83, pp. 169–176, 2001.
- [49] J. Kim, Y. Ha, K. Jung, C. Choi and C. Chae, "Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs," pp. 218–221, 2004.
- [50] T. Opriessnig and I. Langohr, "Current State of Knowledge on Porcine Circovirus Type 2-Associated Lesions," *Vet. Pathol.*, vol. 50, no. 1, pp. 23–38, 2013, doi: 10.1177/0300985812450726.
- [51] Q. Liu, L. Wang, P. Willson and L. A. Babiuk, "Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 9, pp. 3474–3477, 2000, doi: 10.1128/jcm.38.9.3474-3477.2000.
- [52] P. Baekbo, C. S. Kristensen and L. E. Larsen, "Porcine Circovirus Diseases: A review of PMWS," *Transbound. Emerg. Dis.*, vol. 59, no. SUPPL. 1, pp. 60–67, 2012, doi: 10.1111/j.1865-1682.2011.01288.x.
- [53] J. Kim and C. Chae, "A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs," *J. Vet. Diagnostic Investig.*, vol. 16, no. 1, pp. 45–50, 2004, doi: 10.1177/104063870401600108.
- [54] J. Segalés, M. Calsamiglia, A. Olvera, M. Sibila, L. Badiella and M. Domingo, "Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)," *Vet. Microbiol.*, vol. 111, no. 3–4, pp. 223–229, 2005, doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.008.
- [55] J. Segalés, "Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis," *Virus Res.*, vol. 164, no. 1–2, pp. 10–19, 2012, doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007.
- [56] L. Grau-Roma, C. K. Hjulsager, M. Sibila, C. S. Kristensen, S. López-Soria, C. Enøe, J. Casal, A. Bøtner, M. Nofrariás, V. Bille-Hansen, L. Fraile, P. Baekbo, J. Segalés and L. E. Larsen, "Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark," *Vet. Microbiol.*, vol. 135, no. 3–4, pp. 272–282, 2009, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.007.

- [57] S. Faine, B. Adler, “Leptospira and leptospirosis,” *MedSci, Melb.*, 1999.
- [58] B. Adler and A. de la Peña Moctezuma, “Leptospira and leptospirosis,” *Vet. Microbiol.*, vol. 140, no. 3–4, pp. 287–296, 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- [59] G. M. Cerqueira and M. Picardeau, “A century of Leptospira strain typing,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 9, no. 5, pp. 760–768, 2009, doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009.
- [60] M. Picardeau, *Leptospira and Leptospirosis*, vol. 2134. 2020. doi: 10.1007/978-1-0716-0459-5_24.
- [61] P. N. Levett, “Leptospirosis,” vol. 14, no. 2, pp. 296–326, 2001, doi: 10.1128/CMR.14.2.296.
- [62] F. Costa, J. E. Hagan, J. Calcagno, M. Kane, P. Torgerson, M. S. Martinez-Silveira, C. Stein, B. Abela-Ridder and A. I. Ko, “Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 9, pp. 0–1, 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.
- [63] A. Poudel, M. M. Hoque, S. Madere, S. Bolds, S. Price, S. Barua, F. Adekanmbi, A. Kalalah, S. Kitchens, V. Brown, C. Wang and B. G. Lockaby, “Molecular and serological prevalence of leptospira spp. In feral pigs (*sus scrofa*) and their habitats in Alabama, USA,” *Pathogens*, vol. 9, no. 10, pp. 1–10, 2020, doi: 10.3390/pathogens9100857.
- [64] W. A. Ellis, *Animal Leptospirosis*, vol. 387. 2015. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_6.
- [65] F. Bertelloni, B. Turchi, E. Vattiata, P. Viola, S. Pardini, D. Cerri and F. Fratini, “Serological survey on Leptospira infection in slaughtered swine in North-Central Italy,” *Epidemiol. Infect.*, vol. 146, no. 10, pp. 1275–1280, 2018, doi: 10.1017/S0950268818001358.
- [66] C. Fennestad, K.L. Borg-Petersen, “Experimental leptospirosis in pregnant swine,” *J. Infect. Dis.*, vol. 116, no. 1, pp. 57–66, 1966.
- [67] E. G. Hartman, B. Brummelman and H. Dikken, “Leptospirae of serotype lora of the serogroup Australis isolated for the first time from swine in the Netherlands.,” *Tijdschr. Diergeneeskd.*, vol. 100, no. 8, pp. 421–425, Apr. 1975.
- [68] W. A. Ellis, J. M. Montgomery and A. B. Thiermann, “Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of Leptospira interrogans,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 29, no. 5, pp. 957–961, 1991, doi: 10.1128/jcm.29.5.957-961.1991.
- [69] C. A. Bolin and J. A. Cassells, “Isolation of Leptospira interrogans serovar bratislava from stillborn and weak pigs in Iowa.,” *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 196, no. 10, pp. 1601–1604, May 1990.
- [70] K. Scheinpflug, S. Schiller, H. Jäkel, M. Schulze, D. Waberski and K. Mühlendorfer, “Relevance of Leptospira in boar and for the development of alternative

- antimicrobial concepts in boar semen preservation,” *Porc. Heal. Manag.*, vol. 6, no. 1, pp. 4–7, 2020, doi: 10.1186/s40813-020-00169-9.
- [71] K. Strutzberg-Minder, A. Tschentscher, M. Beyerbach, M. Homuth and L. Kreienbrock, “Passive surveillance of *Leptospira* infection in swine in Germany,” *Porc. Heal. Manag.*, vol. 4, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1186/s40813-018-0086-5.
- [72] C. Fearnley, P. R. Wakeley, J. Gallego-Beltran, C. Dalley, S. Williamson, C. Gaudie and M. J. Woodward, “The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue,” *Res. Vet. Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 8–16, 2008, doi: 10.1016/j.rvsc.2007.09.005.
- [73] A. A. Ahmed, M. G. A. Goris and M. C. Meijer, “Development of lipL32 real-time PCR combined with an internal and extraction control for pathogenic *Leptospira* detection,” *PLoS One*, vol. 15, no. 11 November, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0241584.
- [74] L. J. Pérez, S. Lanka, V. J. DeShambo, R. L. Fredrickson and C. W. Maddox, “A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious *Leptospira* spp.: A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, no. March, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00457.
- [75] S. Essendoubi, X. Yang, R. King, J. Keenlside, J. Bahamon, J. Diegel, P. Lu, R. Cassis, G. Gensler, N. Stashko and D. Rolheiser, “Prevalence and Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Pork Carcasses and in Swine Colon Contents from Provincially Licensed Abattoirs in Alberta, Canada,” *J. Food Prot.*, vol. 83, no. 11, pp. 1909–1917, 2020, doi: 10.4315/JFP-20-146.
- [76] J. S. Pearson, C. Giogha, T. Wong Fok Lung and E. L. Hartland, “The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 50, pp. 493–513, 2016, doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035138.
- [77] L. Postow, C. D. Hardy, J. Arsuaga and N. R. Cozzarelli, “Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome,” *Genes Dev.*, vol. 18, no. 14, pp. 1766–1779, 2004, doi: 10.1101/gad.1207504.
- [78] O. Clermont, J. K. Christenson, E. Denamur and D. M. Gordon, “The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups,” *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 5, no. 1, pp. 58–65, 2013, doi: 10.1111/1758-2229.12019.
- [79] E. W. A. Bok, J. Mazurek, P. Pusz and M. Stosik, “Age as a Factor Influencing Diversity of Commensal *E. coli* Microflora in Pigs,” vol. 62, no. 2, pp. 165–171, 2013.
- [80] H. R. Gaskins, C. T. Collier and D. B. Anderson, “Antibiotics as growth promotants: Mode of action,” *Anim. Biotechnol.*, vol. 13, no. 1, pp. 29–42, 2002, doi: 10.1081/ABIO-120005768.
- [81] M. Rhouma, J. M. Fairbrother, F. Beaudry and A. Letellier, “Post weaning diarrhea in pigs: Risk factors and non-colistin-based control strategies,” *Acta Vet. Scand.*,

vol. 59, no. 1, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1186/s13028-017-0299-7.

- [82] T. A. T. Gomes, W. P. Elias, I. C. A. Scaletsky, B. E. C. Guth, J. F. Rodrigues, R. M. F. Piazza, L. C. S. Ferreira and M. B. Martinez, “Diarrheagenic *Escherichia coli*,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 47, pp. 3–30, 2016, doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015.
- [83] V. C. Johanns, L. Epping, T. Semmler, F. Ghazisaeedi, A. Lübke-Becker, Y. Pfeifer, I. Eichhorn, R. Merle, A. Bethe, B. Walther and L. H. Wieler, “High-Zinc Supplementation of Weaned Piglets Affects Frequencies of Virulence and Bacteriocin Associated Genes Among Intestinal *Escherichia coli* Populations,” *Front. Vet. Sci.*, vol. 7, no. December, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fvets.2020.614513.
- [84] J. M. Campbell, J. D. Crenshaw and J. Polo, “The biological stress of early weaned piglets,” *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 2–5, 2013, doi: 10.1186/2049-1891-4-19.
- [85] M. Docic and G. Bilkei, “Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics,” *J. Vet. Med. Ser. B*, vol. 50, no. 1, pp. 27–30, 2003, doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00609.x.
- [86] Y. Liu, C. D. Espinosa, J. J. Abelilla, G. A. Casas, L. V. Lagos, S. A. Lee, W. B. Kwon, J. K. Mathai, D. M. D. L. Navarro, N. W. Jaworski and H. H. Stein, “Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review,” *Anim. Nutr.*, vol. 4, no. 2, pp. 113–125, 2018, doi: 10.1016/j.aninu.2018.01.007.
- [87] C. Lupp, M. L. Robertson, M. E. Wickham, I. Sekirov, O. L. Champion, E. C. Gaynor and B. B. Finlay, “Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae,” *Cell Host Microbe*, vol. 2, no. 2, pp. 119–129, 2007, doi: 10.1016/j.chom.2007.06.010.
- [88] T. A. Chapman, X. Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson and J. J. C. Chin, “Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 7, pp. 4782–4795, 2006, doi: 10.1128/AEM.02885-05.
- [89] J. M. Pickard, M. Y. Zeng, R. Caruso and G. Núñez, “Gut Microbiota: Role in Pathogen Colonization, Immune Responses and Inflammatory Disease,” *Immunol. Rev.*, vol. 279, no. 1, pp. 70–89, 2017, doi: 10.1111/imr.12567.Gut.
- [90] V. García, M. Gambino, K. Pedersen and S. Haugegaard, “F4- and F18-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrhea of Postweaning Pigs: Genomic Characterization Vanesa,” no. November, pp. 1–18, 2020.
- [91] J. Harel, H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere and J. M. Fairbrother, “Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 29, no. 4, pp. 745–752, 1991, doi: 10.1128/jcm.29.4.745-752.1991.

- [92] M. K. Wolf, "Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 10, no. 4, pp. 569–584, 1997, doi: 10.1128/cmr.10.4.569-584.1997.
- [93] R. Prager, U. Strutz, A. Fruth and H. Tschäpe, "Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: Serotyping versus flic polymorphisms," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 292, no. 7–8, pp. 477–486, 2003, doi: 10.1078/1438-4221-00226.
- [94] C. Debroy, P. M. Fratamico and E. Roberts, "Molecular serogrouping of *Escherichia coli*," *Anim. Heal. Res. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1017/S1466252317000093.
- [95] P. Schierack, S. Rödiger, C. Kuhl, R. Hiemann, D. Roggenbuck, G. Li, J. Weinreich, E. Berger, L. K. Nolan, B. Nicholson, A. Römer, U. Frömmel, L. H. Wieler and C. Schröder, "Porcine *E. coli*: Virulence-Associated Genes, Resistance Genes and Adhesion and Probiotic Activity Tested by a New Screening Method," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0059242.
- [96] N. Botteldoorn, M. Heyndrickx, N. Rijpens and L. Herman, "Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs," *Res. Microbiol.*, vol. 154, no. 2, pp. 97–104, 2003, doi: 10.1016/S0923-2508(03)00028-7.
- [97] S. J. Weissman, J. R. Johnson, V. Tchesnokova, M. Billig, D. Dykhuizen, K. Riddell, P. Rogers, X. Qin, S. Butler-Wu, B. T. Cookson, F. C. Fang, D. Scholes, S. Chattopadhyay and E. Sokurenko, "High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 5, pp. 1353–1360, 2012, doi: 10.1128/AEM.06663-11.
- [98] F. Kauffmann, "The Serology of the Coli Group," *J. Immunol.*, vol. 57, no. 1, pp. 71 LP – 100, Sep. 1947, [Online]. Available: <http://www.jimmunol.org/content/57/1/71.abstract>
- [99] J. Machado, F. Grimont and P. A. D. Grimont, "Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene," *Res. Microbiol.*, vol. 151, no. 7, pp. 535–546, 2000, doi: 10.1016/S0923-2508(00)00223-0.
- [100] S. Delannoy, L. Beutin and P. Fach, "Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from Non-EHEC strains based on detection of various combinations of Type III effector genes," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 10, pp. 3257–3262, 2013, doi: 10.1128/JCM.01471-13.
- [101] D. J. Botkin, L. Galli, V. Sankarapani, M. Soler, M. Rivas and A. G. Torres, "Development of a multiplex PCR assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, and enteropathogenic *E. coli* strains," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 2, no. February, p. 8, 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00008.
- [102] N. V. Hegde, C. Praul, A. Gehring, P. Fratamico and C. DebRoy, "Rapid O

- serogroup identification of the six clinically relevant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by antibody microarray,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 93, no. 3, pp. 273–276, 2013, doi: 10.1016/j.mimet.2013.03.024.
- [103] N. V. Hegde, B. M. Jayarao and C. DebRoy, “Rapid detection of the top six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O groups in ground beef by flow cytometry,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 6, pp. 2137–2139, 2012, doi: 10.1128/JCM.00137-12.
- [104] Z. R. Stromberg, N. W. Baumann, G. L. Lewis, N. J. Severt, N. Cernicchiaro, D. G. Renter, D. B. Marx, R. K. Phebus and R. A. Moxley, “Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 on hides and preintervention carcass surfaces of feedlot cattle at harvest,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 12, no. 7, pp. 631–638, 2015, doi: 10.1089/fpd.2015.1945.
- [105] K. G. Joensen, A. M. M. Tetzschner, A. Iguchi, F. M. Aarestrup and F. Scheutz, “Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 8, pp. 2410–2426, 2015, doi: 10.1128/JCM.00008-15.
- [106] A. Vidal, G. E. Martín-Valls, M. Tello, E. Mateu, M. Martín and L. Darwich, “Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain,” *Vet. Microbiol.*, vol. 237, no. September, p. 108419, 2019, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108419.
- [107] W. Zhang, M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot and D. Francis, “Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US,” *Vet. Microbiol.*, vol. 123, no. 1–3, pp. 145–152, 2007, doi: 10.1016/j.vetmic.2007.02.018.
- [108] W. Wang, R. T. Zijlstra and M. G. Gänzle, “Identification and quantification of virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* by high-resolution melting curve quantitative PCR,” *BMC Microbiol.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1186/s12866-017-1023-5.
- [109] S. Bekal, R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother and J. Harel, “Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 5, pp. 2113–2125, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.5.2113-2125.2003.
- [110] G. Bacteria, “Oral Mucosal Microbes,” *Atlas Oral Microbiol.*, pp. 95–107, 2015, doi: 10.1016/b978-0-12-802234-4.00005-7.
- [111] S. Razin, “The mycoplasmas,” *Microbiol. Rev.*, vol. 42, no. 2, pp. 414–470, 1978, doi: 10.1128/membr.42.2.414-470.1978.
- [112] Y. Razin, S., Yogeve, D., Naost, “Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 1094–1156, 1998, doi: 10.1111/aab.12151.
- [113] A. P. Fraga, T. De Vargas, N. Ikuta, A. S. K. Fonseca, Á. J. Celmer, E. K. Marques

- and V. R. Lunge, “A multiplex real-time pcr for detection of mycoplasma gallisepticum and mycoplasma synoviae in clinical samples from brazilian commercial poultry flocks,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 505–510, 2013, doi: 10.1590/S1517-83822013000200028.
- [114] N. Ferguson-Noel, “Mycoplasmosis,” *Dis. Poult. Thirteen. Ed.*, no. 54, pp. 875–876, 2017, doi: 10.1002/9781119421481.ch21.
- [115] A. Matucci, E. Stefani, M. Gastaldelli, I. Rossi, G. De Grandi, M. Gyuranecz and S. Catania, “Molecular differentiation of mycoplasma gallisepticum outbreaks: A last decade study on italian farms using gts and mlst,” *Vaccines*, vol. 8, no. 4, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/vaccines8040665.
- [116] S. Levisohn and S. H. Kleven, “Avian mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum),” *Sci. Tech. Rev. Off. Int. des Epizoot.*, vol. 19, no. 2, pp. 425–442, 2000.
- [117] B. Xu, R. Liu, M. Ding, J. Zhang, H. Sun, C. Liu, F. Lu, S. Zhao, Q. Pan and X. Zhang, “Interaction of Mycoplasma synoviae with chicken synovial sheath cells contributes to macrophage recruitment and inflammation,” *Poult. Sci.*, vol. 99, no. 11, pp. 5366–5377, 2020, doi: 10.1016/j.psj.2020.08.003.
- [118] F. Dufour-Gesbert, A. Dheilily, C. Marois and I. Kempf, “Epidemiological study on Mycoplasma synoviae infection in layers,” *Vet. Microbiol.*, vol. 114, no. 1–2, pp. 148–154, 2006, doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.040.
- [119] O. Kurska, A. Pakuła, G. Tomczyk, S. Paško and A. Sawicka, “Eggshell apex abnormalities caused by two different Mycoplasma synoviae genotypes and evaluation of eggshell anomalies by full-field optical coherence tomography,” *BMC Vet. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12917-018-1758-8.
- [120] A. K. Reinhardt, A. V. Gautier-Bouchardon, M. Gicquel-Bruneau, M. Kobisch and I. Kempf, “Persistence of Mycoplasma gallisepticum in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance,” *Vet. Microbiol.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 129–137, 2005, doi: 10.1016/j.vetmic.2004.11.016.
- [121] S. Catania, M. Bottinelli, A. Fincato, M. Gastaldelli, A. Barberio, F. Gobbo and G. Vicenzoni, “Evaluation of Minimum Inhibitory Concentrations for 154 Mycoplasma synoviae isolates from Italy collected during 2012-2017,” *PLoS One*, vol. 14, no. 11, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0224903.
- [122] A. Di Pasquale, S. Preiss, F. T. Da Silva and N. Garçon, “Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond,” *Vaccines*, vol. 3, no. 2, pp. 320–343, 2015, doi: 10.3390/vaccines3020320.
- [123] A. Feberwee, R. Dijkman, J. Wiegel, C. ter Veen, H. Bataille, R. Bouwstra and S. de Wit, “Rate of false positive reactions in 11 M. gallisepticum and M. synoviae serological tests in samples obtained from SPF birds inoculated with heterologous mycoplasma species,” *Avian Pathol.*, vol. 49, no. 2, pp. 179–184, 2020, doi: 10.1080/03079457.2019.1702148.
- [124] V. Felice, C. Lupini, G. Mescolini, F. Silveira, A. Guerrini, E. Catelli and A. Di

- Francesco, “Molecular detection and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* strains in backyard poultry in Italy,” *Poult. Sci.*, vol. 99, no. 2, pp. 719–724, 2020, doi: 10.1016/j.psj.2019.12.020.
- [125] A. Feberwee, D. R. Mekkes, J. J. De Wit, E. G. Hartman and A. Pijpers, “Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections,” *Avian Dis.*, vol. 49, no. 2, pp. 260–268, 2005, doi: 10.1637/7274-090804R.
- [126] T. J. H. Faragher, “A comparison of commercial *Mycoplasma gallisepticum* antigens in the Rapid serum agglutination test,” vol. 51, pp. 566–569, 1975.
- [127] S. H. Kleven, N. Ferguson-Noel, Z. Raviv, R. Wooten and V. Laibinis, “Serological responses of chickens to low challenge doses of *Mycoplasma synoviae*,” *Avian Dis.*, vol. 51, no. 3, pp. 738–743, 2007, doi: 10.1637/0005-2086(2007)51[738:SROCTL]2.0.CO;2.
- [128] B. Ben Abdelmoumen Mardassi, A. A. Béjaoui, L. Oussaeif, B. Mlik and F. Amouna, “A recombinant antigen-based ELISA for the simultaneous differential serodiagnosis of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and *Mycoplasma meleagridis* infections,” *Avian Dis.*, vol. 52, no. 2, pp. 214–221, 2008, doi: 10.1637/8071-071207-Reg.1.
- [129] M. García, N. Ikuta, S. Levisohn and S. H. Kleven, “Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens,” *Avian Dis.*, vol. 49, no. 1, pp. 125–132, 2005, doi: 10.1637/7261-0812204R1.
- [130] A. Hopert, C. C. Uphoff, M. Wirth, H. Hauser, H. G. Drexler, “*Mycoplasma* detection by PCR analysis,” *In Vitro*, no. 17, pp. 819–821, 1993.
- [131] S. Levisohn, R. Rosengarten and D. Yogev, “In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens,” *Vet. Microbiol.*, vol. 45, no. 2–3, pp. 219–231, 1995, doi: 10.1016/0378-1135(95)00039-D.
- [132] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux and H. G. Khorana, “Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA’s as catalyzed by DNA polymerases,” *J. Mol. Biol.*, vol. 56, no. 2, pp. 341–361, 1971, doi: 10.1016/0022-2836(71)90469-4.
- [133] F. A. Mullis, Karby B., Faloona, “Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction,” *Methods Enzymol.*, vol. 155, pp. 335–350, 1987.
- [134] J. M. Butler, “DNA Amplification (The Polymerase Chain Reaction),” *Fundam. Forensic DNA Typing*, pp. 125–146, 2010, doi: 10.1016/b978-0-12-374999-4.00007-2.
- [135] J. Kuypers and K. R. Jerome, “Applications of digital PCR for clinical microbiology,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1621–1628, 2017, doi: 10.1128/JCM.00211-17.

- [136] J. M. Butler, "DNA Quantitation," *Fundam. Forensic DNA Typing*, pp. 111–124, 2010, doi: 10.1016/b978-0-12-374999-4.00006-0.
- [137] I. M. Mackay, "Real-time PCR in the microbiology laboratory," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 10, no. 3, pp. 190–212, 2004, doi: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.
- [138] T. G. Hungerford, *Diseases of Swine*, vol. 55, no. 4. 1979. doi: 10.1111/j.1751-0813.1979.tb15277.x.
- [139] R. M. Molina, E. A. Nelson, J. Christopher-Hennings, R. Hesse, R. R. R. Rowland and J. J. Zimmerman, "Evaluation of the risk of PRRSV transmission via ingestion of muscle from persistently infected pigs," *Transbound. Emerg. Dis.*, vol. 56, no. 1–2, pp. 1–8, 2009, doi: 10.1111/j.1865-1682.2008.01052.x.
- [140] P. Pesente, V. Rebonato, G. Sandri, D. Giovanardi, L. S. Ruffoni and S. Torriani, "Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management," *Vet. Microbiol.*, vol. 114, no. 3–4, pp. 214–224, 2006, doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.061.
- [141] A. Kittawornrat, J. Prickett, W. Chittick, C. Wang, M. Engle, J. Johnson, D. Patnayak, T. Schwartz, D. Whitney, C. Olsen, K. Schwartz and J. Zimmerman, "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?," *Virus Res.*, vol. 154, no. 1–2, pp. 170–176, 2010, doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.025.
- [142] N. H. Chen, X. Z. Chen, D. M. Hu, X. L. Yu, L. L. Wang, W. Han, J. J. Wu, Z. Cao, C. Bin Wang, Q. Zhang, B. Y. Wang and K. G. Tian, "Rapid differential detection of classical and highly pathogenic North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in China by a duplex real-time RT-PCR," *J. Virol. Methods*, vol. 161, no. 2, pp. 192–198, 2009, doi: 10.1016/j.jviromet.2009.06.007.
- [143] W. Lurchachaiwong, S. Payungporn, U. Srisatidnarakul, C. Mungkundar, A. Theamboonlers and Y. Poovorawan, "Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 46, no. 1, pp. 55–60, 2008, doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02259.x.
- [144] A. Caprioli, F. McNeilly, I. McNair, P. Lagan-Tregaskis, J. Ellis, S. Krakowka, J. McKillen, F. Ostanello and G. Allan, "PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs," *Res. Vet. Sci.*, vol. 81, no. 2, pp. 287–292, 2006, doi: 10.1016/j.rvsc.2006.01.001.
- [145] E. K. Link, M. Eddicks, L. Nan, M. Ritzmann, G. Sutter and R. Fux, "Discriminating the eight genotypes of the porcine circovirus type 2 with TaqMan-based real-time PCR," *Virol. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1186/s12985-021-01541-z.

- [146] Z. Zeng, Z. Liu, W. Wang, D. Tang, H. Liang and Z. Liu, “Establishment and application of a multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of six viruses in swine,” *J. Virol. Methods*, vol. 208, pp. 102–106, 2014, doi: 10.1016/j.jviromet.2014.08.001.
- [147] C. K. Hjulsager, L. Grau-Roma, M. Sibila, C. Enøe, L. Larsen and J. Segalés, “Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples,” *Vet. Microbiol.*, vol. 133, no. 1–2, pp. 172–178, 2009, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.014.
- [148] R. Steinparzer, T. Mair, C. Unterweger, A. Steinrigl and F. Schmoll, “Influence of selective agents (Emjh-staff), sample filtration and ph on leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae cultivation and isolation from swine urine,” *Vet. Sci.*, vol. 8, no. 6, 2021, doi: 10.3390/vetsci8060090.
- [149] M. C. Ospina-Pinto and P. Hernández-Rodríguez, “Identification of *Leptospira* spp. in the animal-environment interface (swine-water) in pig production cycle,” *Trop. Anim. Health Prod.*, vol. 53, no. 1, 2021, doi: 10.1007/s11250-021-02567-9.
- [150] G. Cilia, F. Bertelloni, I. Piredda, M. N. Ponti, B. Turchi, C. Cantile, F. Parisi, P. Pinzauti, A. Armani, B. Palmas, M. Noworol, D. Cerri and F. Fratini, “Presence of pathogenic leptospira spp. In the reproductive system and fetuses of wild boars (*sus scrofa*) in Italy,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 14, no. 12, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0008982.
- [151] M. Ståhl, B. Kokotovic, C. K. Hjulsager, S. Breum and Angen, “The use of quantitative PCR for identification and quantification of *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis* and *Escherichia coli* fimbrial types F4 and F18 in pig feces,” *Vet. Microbiol.*, vol. 151, no. 3–4, pp. 307–314, 2011, doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.013.
- [152] K. T. Carli and A. Eyigor, “Real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea,” *Avian Dis.*, vol. 47, no. 3, pp. 712–717, 2003, doi: 10.1637/6041.
- [153] Z. Raviv and S. H. Kleven, “The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas,” *Avian Dis.*, vol. 53, no. 1, pp. 103–107, 2009, doi: 10.1637/8469-091508-Reg.1.
- [154] C. Marois, C. Savoye, M. Kobisch and I. Kempf, “A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples,” *Vet. Microbiol.*, vol. 89, no. 1, pp. 17–28, 2002, doi: 10.1016/S0378-1135(02)00159-1.
- [155] J. Fan, P. F. Gerber, A. Cubas Atienzar, L. Eppink, C. Wang and T. Opriessnig, “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA detection in different matrices under typical storage conditions in the UK,” *Vet. Rec.*, vol. 185, no. 1, p. 21, 2019, doi: 10.1136/vr.105312.
- [156] S. K. Kritas and R. B. Morrison, “An observational study on tail biting in

- commercial grower-finisher barns,” *J. Swine Heal. Prod.*, vol. 12, no. 1, pp. 17–22, 2004.
- [157] M. Calsamiglia, J. Segalés, J. Quintana, C. Rosell and M. Domingo, “Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 5, pp. 1848–1850, 2002, doi: 10.1128/JCM.40.5.1848-1850.2002.
- [158] F. Morandi, S. Panarese, R. Verin, F. Ostanello, C. Benazzi and G. Sarli, “PCV2-DNA in formalin-fixed and paraffin embedded lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa* ssp. *scrofa*): One sampling approach for two laboratory techniques,” *Acta Vet. Scand.*, vol. 54, no. 1, p. 17, 2012, doi: 10.1186/1751-0147-54-17.
- [159] C. Weissenbacher-Lang, T. Kristen, V. Mendel, R. Brunthaler, L. Schwarz and H. Weissenböck, “Porcine circovirus type 2 (PCV2) genotyping in Austrian pigs in the years 2002 to 2017,” *BMC Vet. Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1186/s12917-020-02413-4.
- [160] S. S. Grierson, D. Werling, C. Bidewell and S. Williamson, “Characterisation of porcine circovirus type 2 in porcine circovirus disease cases in England and Wales,” *Vet. Rec.*, vol. 182, no. 1, p. 22, 2018, doi: 10.1136/vr.104450.
- [161] A. L. Zilber, P. Belli, M. Artois, A. Kodjo and Z. Djelouadji, “First Observation of *Leptospira interrogans* in the Lungs of *Rattus norvegicus*,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/9656274.
- [162] M. I. N. Di Azevedo and W. Lilenbaum, “An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 72, no. 5, pp. 496–508, 2021, doi: 10.1111/lam.13442.
- [163] C. L. R. M. Pimenta, D. F. da Costa, M. L. C. R. Silva, H. D. Pereira, J. P. A. Júnior, C. D. Malossi, L. S. Ullmann, C. J. Alves and S. S. de Azevedo, “Strategies of the control of an outbreak of leptospiral infection in dairy cattle in Northeastern Brazil,” *Trop. Anim. Health Prod.*, vol. 51, no. 1, pp. 237–241, 2019, doi: 10.1007/s11250-018-1635-2.
- [164] K. Ikwap, J. Larsson, M. Jacobson, D. O. Owiny, G. W. Nasinyama, I. Nabukenya, S. Mattsson, A. Aspan and J. Erume, “Prevalence of adhesin and toxin genes in *E. coli* strains isolated from diarrheic and non-diarrheic pigs from smallholder herds in northern and eastern Uganda,” *BMC Microbiol.*, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1186/s12866-016-0796-2.
- [165] C. Ball, V. Felice, Y. Ding, A. Forrester, E. Catelli and K. Ganapathy, “Influences of swab types and storage temperatures on isolation and molecular detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*,” *Avian Pathol.*, vol. 49, no. 1, pp. 106–110, 2020, doi: 10.1080/03079457.2019.1675865.
- [166] T. Michiels, S. Welby, M. Vanrobaeys, C. Quinet, L. Rouffaer, L. Lens, A. Martel and P. Butaye, “Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium,” *Avian Pathol.*, vol. 45, no. 2, pp. 244–252, 2016, doi: 10.1080/03079457.2016.1145354.

- [167] Ingenetix, “ViroReal ® Kit PRRS Virus EU & NA 1.1,” pp. 1–9, 2018.
- [168] Exopol, “EXOone PCV2 one MIX,” pp. 1–4, 2015.
- [169] Exopol, “EXOone Pathogenic Leptospira oneMIX,” pp. 1–4, 2015.
- [170] Ingenetix, “BactoReal ® Kit Mycoplasma gallisepticum & synoviae,” vol. 43, no. 0, pp. 198–199, 2009.

VIII. Anexos

Tabela A1. Princípios a obter da amplificação do PRRS para interpretar o resultado como válido. *Caso o alvo RNA IPC tenha sido adicionado à *Master Mix*. Retirado de [167].

	C _T (canal FAM) Alvo -PRRSV EU	C _T (canal VIX/HEX) Alvo – PRRSV NA	C _T (canal Cy5) Alvo – RNA IPC	Interpretação do resultado
Controlo negativo	Negativo	Negativo	26-29*	Válido
Controlo positivo (diluído 1:500), approx. 100 000 cópias, 1 µL	23-26	23-26	26-29*	Válido
Controlo negativo da extração (opcional)	Negativo	Negativo	26-29	Válido
Amostra negativa	Negativo	Negativo	26-29	Válido
Amostra positiva para o PRRS EU	Positivo	Negativo	26-29/negativo	Válido
Amostra positiva para o PRRS NA	Negativo	Positivo	26-29/negativo	Válido

Tabela A2. Princípios a obter da amplificação do PCV2 para interpretar o resultado como válido. Retirado de [168].

Amostra (canal FAM) Positiva se o C _T ≤ 38	Controlo Positivo (canal FAM)	Controlo Negativo (canal FAM)	Controlo endógeno das amostras (canal HEX)	Interpretação do resultado
Positivo	Positivo	Negativo	Não se considera	Válido
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Válido
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não é válido
Positivo/Negativo	Negativo	Negativo	Positivo/negativo	Não é válido
Positivo/Negativo	Positivo	Positivo	Positivo/negativo	Não é válido

Tabela A3. Princípios a obter da amplificação da *Leptospira* para interpretar o resultado como válido ou não válido. Retirado de [169].

Amostra (FAM) Positiva se o $C_T \leq 38$	Controlo positivo (canal FAM)	Controlo negativo (canal FAM)	Controlo endógeno (canal HEX)	Interpretação do resultado
Positivo	Positivo	Negativo	Não se considera	Valido
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Valido
Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não é válido
Positivo/negativo	Negativo	Positivo	Positivo/negativo	Não é valido
Positivo/negativo	Positivo	Positivo	Positivo/negativo	Não é válido

Tabela A4. Princípios a obter da amplificação de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* para interpretar o resultado como válido. Retirado de [170].

	C_T (canal FAM) <i>M. gallisepticum</i>	C_T (canal VIC/HEX) <i>M. synoviae</i>	C_T (canal Cy5) alvo IPC	Interpretação do resultado
Controlo negativo	Negativo	Negativo	36 ± 2	Válido
Controlo positivo	28-31	28-31	36 ± 2	Válido
Controlo negativo da extração (opcional)	Negativo	Negativo	36 ± 2	Válido
Amostra negativa	Negativo	Negativo	36 ± 2	Válido
Amostra positiva para o <i>M. gallisepticum</i>	Positivo	Negativo	Positivo/negativo	Válido
Amostra positiva para o <i>M. synoviae</i>	Negativo	Positivo	Positivo/negativo	Válido