PEDRO HENRIQUE NOGUEIRA DE LIMA FILSNER

**Caracterização de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*
sorovar Cholerasuis provenientes de suínos no Brasil**

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

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2018

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3689
FMVZ

Filsner, Pedro Henrique Nogueira de Lima
Caracterização de *Salmonella enterica* subespécie enterica sorovar Choleraesuis
provenientes de suínos no Brasil / Pedro Henrique Nogueira de Lima Filsner. – 2018.
41 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2018.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Orientadora: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Suínos. 2. *Salmonella Choleraesuis*. 3. Resistência. 4. AFLP. 5. CIM. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Resistência a Colistina: Papel do suíno como reservatório de genes *mcr-1*, *mcr-2* e *mcr-3* em sistemas de produção intensiva no Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 5446170717 ~~em anexo~~, sob a responsabilidade de **Andrea Mücke Moreno e equipe** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/05/2018.

We certify that the proposal "Colistin Resistance: Role of swine as reservoir of genes *mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3* in intensive production systems in Brazil.", utilizing 750 Swines (males and females), protocol number CEUA 5446170717 ~~is annexed~~, under the responsibility of **Andrea Mücke Moreno and team** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 08/2019

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **65 a 75 dias**

N: **750**

Linhagem: **Large White**

Peso: **25 a 30 kg**

Local do experimento: As coletas serão realizadas em cinco diferentes sistemas intensivos de produção de suínos. Nenhum animal será realocado. As amostras serão processadas no Laboratório de Sanidade Suína FMVZ USP.

São Paulo, 03 de agosto de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FILSNER, Pedro Henrique Nogueira de Lima

Título: Caracterização de Salmonella enterica subespécie enterica sorovar Cholerasuis provenientes de suínos no Brasil

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus amados pais,
por sua dedicação e
carinho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais e minha querida avó Ilda, pessoas valorosas, que com luta, dedicação e carinho tornaram esta etapa da minha vida possível.

À Prof. Dra. Andrea Micke Moreno, à confiança depositada em mim, aceitando que fizesse parte da equipe do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia. Por toda sua atenção e, sobretudo, o empenho estando sempre disposta a ajudar, não só a mim, mas todos seus orientados.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia: Ana Paula Santos da Silva, Vasco Túlio de Moura Gomes, Cleise Ribeiro Gomes, Cristina Roman Amigo, Débora Gobbi, Alexandre Sanches, Marina Moreno, Thaís Ferreira, Jucélia, Maria José, Rosi, Maria Garcia Spindola, Carlos Cabrera, Ketrin Silva, Givago Faria, Barbara Costa, Fabiana Miraglia, Luiza Zanolli Moreno, Mirela Oliveira e Maria Gabriela Xavier Oliveira .

Aos funcionários Sandra, Cristina, Virgínea e Danival

À CAPES, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários e proprietários responsáveis pelos locais de coleta.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal.

"O mais profundo dos desejos por conhecimento é o desejo de conhecer o propósito do mundo e de nós mesmos." (G.K. Chesterton)

RESUMO

FILSNER, P. H. N. L. **Caracterização de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis provenientes de suínos no Brasil.** [Characterization of *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis isolated from pigs in Brazil]. 41 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Salmonella Choleraesuis é o agente causador de um quadro septicêmico em suínos que pode apresentar altas taxas de mortalidade nos animais infectados. No presente estudo foram avaliadas 93 estirpes de *S. Choleraesuis* provenientes de suínos com sinais clínicos de infecção. Foram avaliadas estirpes originadas de sete granjas localizadas nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais obtidas durante os anos de 2015, 2016 e 2017. As estirpes de *Salmonella* foram submetidas a reação em cadeia pela polimerase para confirmação do sorovar pela amplificação do gene *fliC*, em seguida foram caracterizadas quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos e a caracterização genotípica pelo polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). A determinação do perfil de resistência a antimicrobianos revelou que as 93 estirpes foram resistentes a penicilina, doxiciclina, sulfadimetoxina, clindamicina, tilosina, tilmicosina e tiamulina, sendo, portanto, todas multirresistentes. Os antimicrobianos com menores taxas de resistência foram cefitiofur (0%), marbofloxacina (1,1%), neomicina (10,8%) e enrofloxacina (18,3%). As estirpes foram discriminadas em 17 perfis de resistência diferentes, o perfil mais frequente reuniu 39 estirpes (42%) resistentes a penicilina, ampicilina, doxiciclina, oxitetraciclina, florfenicol, sulfadimetoxina, gentamicina, tulatromicina, tilosina, tilmicosina, tiamulina e clindamicina. A análise das estirpes pelo AFLP indicou todas as 93 estirpes foram agrupadas em um único perfil com mais de 94% de similaridade. A partir dos dados obtidos é possível verificar que as estirpes de *S. Choleraesuis* isoladas de suínos apresentaram baixa variabilidade genética e alta frequência de resistência aos antimicrobianos mais usados em suinocultura.

Palavras-chave: Suínos. *Salmonella* Choleraesuis. Resistência. AFLP. CIM.

ABSTRACT

FILSNER, P. H. N. L. **Characterization of *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis isolated from pigs in Brazil** [Caracterização de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis provenientes de suínos no Brasil.]. 41 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Salmonella Choleraesuis is the causative agent of septicemia in pigs and may present high mortality rates in infected animals. In the present study, 93 strains of *S. choleraesuis* from pigs with clinical signs of infection were evaluated. Strains from seven farms located in the states of São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Minas Gerais obtained during the years 2015, 2016 and 2017 were evaluated. *Salmonella* strains were submitted to polymerase chain reaction for confirmation of serovar by amplification of the *fliC* gene were then characterized for antimicrobial resistance profile and genotype characterization by amplified fragment length polymorphism (AFLP). The determination of the antimicrobial resistance profile revealed that the 93 strains were resistant to penicillin, doxycycline, sulfadimethoxine, clindamycin, tylosin, tilmicosin and tiamulin, and were therefore multiresistant. The antimicrobials with the lowest resistance rates were cefitiofur (0%), marbofloxacin (1.1%), neomycin (10.8%) and enrofloxacin (18.3%). The strains were discriminated in 17 different resistance profiles, the most frequent profile consisted of 39 strains (42%) resistant to penicillin, ampicillin, doxycycline, oxytetracycline, florfenicol, sulfadimetoxin, gentamicin, tulathromycin, tylosin, tilmicosin, tiamulin and clindamycin. Analysis of the strains by AFLP indicated that all 93 strains were grouped into a single profile with more than 94% similarity. From the data obtained it is possible to verify that the strains of *S. Choleraesuis* isolated from pigs presented low genetic variability and high frequency of resistance to the antimicrobials most used in swine production systems.

Key words: Swine. *Salmonella* Choleraesuis. Resistance, AFLP, MIC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i> principais hospedeiros associados (Adaptado de RYAN et al, 2017)	14
Figura 2: Distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para a realização da microdiluição em caldo.	25
Figura 3 - Distribuição das 93 estirpes de <i>Salmonella Choleraesuis</i> de acordo com o ano de isolamento.....	26
Figura 4- Distribuição das 93 estirpes de <i>Salmonella Choleraesuis</i> de acordo com o ano de isolamento.....	27
Figura 5- Distribuição das 93 estirpes de <i>Salmonella Choleraesuis</i> de acordo com o Estado de isolamento.....	27
Figura 6 - Distribuição das 93 estirpes de <i>Salmonella Choleraesuis</i> de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos.	32
Figura 7- Distribuição das 93 estirpes de <i>Salmonella Choleraesuis</i> de acordo com o perfil genotípico pelo AFLP.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de origem e isolamento das 93 estirpes de <i>Salmonella</i> Choleraesuis incluídas no estudo.	29
Tabela 2 -	Distribuição das 93 estirpes de <i>Salmonella</i> Choleraesuis segundo os valores de CIM obtidos contra os antimicrobianos testados.	31
Tabela 3 -	Variação da CIM, CIM 50, CIM 90 e taxas de resistência de <i>Salmonella</i> Choleraesuis contra os antimicrobianos testados.	32
Tabela 4 -	Perfis de resistência observados dentre as 93 estirpes de <i>Salmonella</i> Choleraesuis testadas.	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Sequência de primers utilizadas para identificação do sorovar <i>Salmonella</i> Choleraesuis	23
-------------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
3	OBJETIVOS	18
4	MATERIAL E METODO	19
4.1	Material	19
4.2	Isolamento e caracterização das estirpes bacterianas	19
4.2.1	Isolamento bacteriano	19
4.2.2	Identificação por MALDI-TOF MS	20
4.3	Identificação do sorovar	21
4.3.1	Extração de DNA	21
4.3.2	Amplificação do DNA	22
4.3.3	Detecção do produto de amplificação	23
4.4	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)	23
4.5	Perfil de resistência a antimicrobianos	24
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	35
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

As infecções por *Salmonella* não tifoide em humanos são um importante problema de saúde pública, apresentam caráter zoonótico e tem ampla dispersão mundial, seus surtos estão relacionados ao consumo de diversos tipos de alimentos, entre eles produtos de origem animal, os quais desempenham um papel importante como fonte de infecção aos seres humanos. Apesar da salmonelose ser associada, frequentemente, ao consumo de ovos e carne de frango, nos últimos anos, é relatado um aumento no número de casos de infecção humana relacionados ao consumo de produtos de origem suína (CASTILLO, MARTÍNEZ, APODACA, 2008; FEDORKA-CRAY, 1994).

A carne suína é a mais consumida e produzida no mundo, sendo que o Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial, sendo ultrapassado apenas pela China, União Europeia, Estados Unidos (ABPA, 2017). A suinocultura brasileira vem apresentando um desempenho crescente nos últimos anos, tanto em volume de produção como na qualidade dos produtos. As exportações da carne suína representam apenas 19,6 % do que é produzido no país, sendo os outros 80,4 % direcionados para o mercado interno. No início da série histórica em 1996, o Brasil exportava 58 mil toneladas de carne suína; atualmente o nível de exportação atingiu a marca de 786 mil toneladas (ABPA, 2017). Esse incremento tem-se refletido em maior participação no mercado internacional, estimando-se que essa tendência levará o país a disputar de forma crescente a participação em mercados cada vez mais exigentes em termos de qualidade de produtos. Sendo assim, a preocupação com o controle de microrganismos transmitidos por alimentos passa a ser um tema de relevância para toda a cadeia produtiva (CARDOSO, 2006; LIMA, MORETTO, RODRIGUES, 2011).

Na espécie suína, os quadros de salmonelose causados por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Choleraesuis apresentam grande impacto econômico, levando a alta mortalidade dos animais infectados e aumento nos gastos com antimicrobianos e outras medidas de controle. Este sorovar é altamente patogênico para os seres humanos, causando geralmente septicemia com pouco envolvimento gastrointestinal (CHIU et al., 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

ETIOLOGIA

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo formado por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, oxidase negativos, catalase positivos, não formadores de esporos, que fermentam glicose e raramente lactose. Sua temperatura ótima de crescimento é 37° C, mas o crescimento tem sido descrito também entre 2 e 4° C e em temperaturas altas como 54° C. Salmonelas podem sobreviver a uma ampla variação de pH, variando entre 3,8 e 9,5, com um pH ótimo entre pH 6,5-7,5 (RYAN et al., 2017).

São produtoras de ácido e gás a partir de D-glicose e outros carboidratos, com exceção da *S. Typhi*, são indol negativas, em sua maioria produzem ácido sulfídrico (H₂S), e são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono (HOLT et al., 1994).

O gênero *Salmonella* é dividido em espécies como os demais gêneros bacterianos, e possui uma classificação antigênica que determina os diferentes sorovares, sendo identificados até o presente momento 2610 sorovares, que são diferenciados de acordo com seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H)

(BRENNER et al., 2000; GUIBOURDENCHE et al., 2010). A nomenclatura de *Salmonella* é complexa e diferentes sistemas têm sido utilizados para referir-se às bactérias desse gênero; entretanto, a padronização da nomenclatura para este gênero facilita a comunicação entre microbiologistas, profissionais da área da saúde e órgãos oficiais de saúde (BRENNER et al., 2000)

Segundo classificação proposta por Popoff, Bockemuhl e Brenner (1998), o gênero divide-se em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica*, por sua vez, subdivide-se em seis subespécies, *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI), enquanto *S. bongori* tem uma única subespécie *bongori* (V) (Figura 1).

Taxonomicamente, a classificação proposta por Popoff e Le Minor (1997) e adotada pelo CDC (*Center of Disease Control and Prevention*) é gênero, espécie, subespécie e sorovar. Desta forma, a nomenclatura para o sorovar Enteritidis é descrita como, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, sendo a denominação abreviada de *Salmonella* ser. Enteritidis ou *Salmonella* Enteritidis (BRENNER et al., 2000; RYAN et al., 2017).

EPIDEMIOLOGIA

As bactérias do gênero *Salmonella* adquiriram ao longo do tempo diversos atributos que garantiram sua vasta distribuição, sendo um agente de ampla distribuição e habitando o trato intestinal de uma ampla variedade de animais, tanto homeotérmicos quanto pecilotérmicos. Entre os fatores que favorecem o sucesso da disseminação do gênero pode-se citar a eficiente eliminação nas fezes de hospedeiros, assim como a boa dispersão por meio de fômites, alimentos, água, vetores e veículos, assim como, uma boa persistência ambiental (Grimont & Wiell,

2007).

Na espécie suína o gênero *Salmonella* tem impacto em saúde pública, devido ao risco contaminação em carcaças, cortes e diferentes produtos de origem animal e apresenta impacto direto sobre a saúde dos animais causando infecções entéricas ou casos de septicemia (CHIU et al., 2014). Os sorovares mais frequentemente associados a infecção em suínos são *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Choleraesuis.

O sorovar Typhimurium geralmente causa quadros de enterite ou enterocolite; no entanto, as infecções por *Salmonella* Typhimurium em suínos podem ser muitas vezes assintomáticas, sendo que os animais infectados eliminam o agente por um longo período, de modo contínuo ou intermitente. A eliminação deste sorovar pelo hospedeiro através das fezes está intimamente relacionada com fatores de estresse, como transporte, superlotação das granjas, privação de alimento ou ainda outras ocorrências de enfermidades (Grimont & Wiell, 2007)

O sorovar Choleraesuis sempre foi mais prevalente em países da América do Norte e em alguns países da Ásia. Em meados da década de noventa este sorovar representava 71% das infecções por salmonela em suínos nos EUA (CARLSON et al. 2012) Brasil e alguns países da Europa as infecções causadas pela *Salmonella* Choleraesuis eram relativamente raras (SIRICHOTE et al. 2010), porém o agente emergiu durante o começo da segunda metade dos anos dois mil na Dinamarca e Brasil, aumentando ainda em países asiáticos como Taiwan e Japão, causando graves surtos na produção suinícola (MATAYOSHI et al., 2008, SIRICHOTE et al. 2010)

Figura 1– Nomenclatura do gênero *Salmonella* principais hospedeiros associados (Adaptado de RYAN et al, 2017)

A introdução dos diferentes sorovares de *Salmonella* na cadeia de produção pode ocorrer de diferentes maneiras, as fontes de infecção podem ser animais pertencentes ao próprio lote, animais de grupos diferentes da mesma granja, animais de reposição ou agentes externos como ração, pessoas e vetores (FEDORKA-CRAY,1997)

Foi estabelecido que há uma importância significativa na introdução de *Salmonella* nas granjas por meio da alimentação, em alguns casos, tem sido demonstrada a relação entre sorovares encontrados em amostras de ração com aqueles recuperados de animais. Embora ingredientes de origem vegetal também possam servir de fonte de contaminação para a ração, a utilização de farinhas de origem animal é apontada como a principal causa da introdução da bactéria na granja (FEDORKA-CRAY,1997). Medidas para manter a alimentação animal livre da contaminação por bactérias do gênero *Salmonella* requerem o tratamento térmico, proteção da ração do contato com reservatórios como pássaros, roedores e materiais contaminados ou contaminação residual em caminhões (FEDORKA-CRAY,1997).

Os diferentes sorovares do gênero *Salmonella* apresentam mais de 200 fatores de virulência descritos, contudo poucos foram completamente caracterizados. Os fatores que promovem a virulência das cepas patogênicas são os envolvidos na adesão, invasão, citotoxicidade e resistência a fagocitose; sendo a ação conjunta destes fatores promovem a doença. (GUEDES et al, 2017)

A infecção, na maioria das vezes é transmitida via oral-fecal, mas também pode ocorrer via aerossol em curtas distâncias. Os dados de morbidade e mortalidade são muito variáveis. No Brasil, embora as informações sejam muito limitadas, quando comparamos estes dados com outros países os problemas clínicos parecem ser menores (15 % morbidade e 4 % a 6 % mortalidade) (GUEDES

et al, 2017, Kich et al. 2017).

SINAIS CLINICOS E LESÕES

O quadro clínico causado pela *Salmonella Choleraesuis* tem morbidade variável, porém dificilmente ultrapassa a taxa dos 10 % e manifesta-se através da inapetência, letargia, febre, dispneia, tosse e icterícia. Os animais podem apresentar o abdômen e extremidades cianóticas, não são raros os casos de morte súbita e não é frequente a observação de episódios diarreicos nestes casos, principalmente antes do quarto dia de manifestação da doença (CARLSON et al., 2012). Conforme a evolução dos casos, são relatados sinais neurológicos devido ao acometimento do sistema nervoso central, um importante diagnostico diferencial para peste suína clássica. Caso a infecção atinja fêmeas em gestação episódios de aborto são esperados. Geralmente os casos de septicemia são observados em animais desmamados e com menos de 5 meses, mas eventualmente leitões lactentes e reprodutores podem apresentar o quadro (CARLSON et al., 2012).

As lesões macroscópicas observadas em animais mortos na fase aguda do quadro de septicemia incluem cianose de orelhas, cauda, membros e da pele da região ventral, alguns animais podem apresentar icterícia. Os linfonodos, principalmente os mesentéricos, podem se apresentar aumentados, edemaciados e congestos, e o baço pode estar aumentado e escurecido. O fígado pode estar aumentado, com focos de necrose no parênquima e a parede da vesícula biliar pode se apresentar espessada e edemaciada. Frequentemente são observadas petéquias e equimoses na região cortical do rim. Pneumonia aguda intersticial evidenciada pelo tecido pulmonar levemente firme, não colapsado e edemaciado é frequente. A mucosa gástrica se apresenta frequentemente congesta. Enterocolite

pode estar presente em alguns casos (CARLSON et al, 2012).

As lesões microscópicas são extensas e envolvem muitos órgãos. As lesões mais características são os focos dispersos de necrose coagulativa que apresentam grau variado de infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos e histiócitos. Necrose coagulativa semelhante pode ser observada no baço ou linfonodos. Outras lesões típicas da salmonelose incluem a presença de trombos fibrinóides em vênulas da mucosa gástrica, nas áreas cianóticas da pele, nos capilares glomerulares, e em menor frequência em vasos pulmonares (CARLSON et al., 2012).

O diagnóstico da infecção pelo sorovar *Choleraesuis* deve ser realizado pelo isolamento do agente a partir dos diferentes órgãos afetados associado ao histórico, às lesões macroscópicas e as lesões microscópicas observadas no exame histopatológico. A isolamento do agente pode ser realizado em ágar MacConkey, Chromagar *Salmonella* ou XLT4 com ou sem enriquecimento seletivo em caldo tetrationsato. A identificação do sorovar *Choleraesuis* pode ser realizada por métodos fenotípico, pela determinação da fórmula antigênica, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) ou pelo sequenciamento do genoma completo (ZHANG et al., 2015).

PREVENÇÃO E CONTROLE

Prevenir a introdução e disseminação de diferentes sorovares do gênero *Salmonella* em rebanhos suínos não tem sido viável. A prevenção de surtos de salmonelose septicêmica pelo sorovar *Choleraesuis* pode ser realizada pelo uso de vacinas vivas atenuadas ou bacterinas (CARLSON et al., 2012).

O uso de antimicrobianos para o tratamento e a prevenção da infecção pelo sorovar

Choleraesuis pode reduzir o impacto da infecção, no entanto a disseminação dos genes de resistência aos diversos antimicrobianos tem sido descrita por diversos autores e a avaliação do perfil de resistência das estirpes antes da implementação do programa de tratamento é recomendado (MATAYOSHI et al., 2015; JING et al., 2015)

Considerando o impacto econômico da *Salmonella Choleraesuis* na produção de suínos e seu potencial zoonótico, o presente estudo tem por objetivos caracterizar estirpes de *Salmonella Choleraesuis* isoladas de suínos provenientes de granjas comerciais no Brasil entre os anos de 2015 e 2017 quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos e pelo polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados.

3 OBJETIVOS

- Caracterizar as estirpes de *Salmonella Choleraesuis* isoladas de suínos entre 2015 e 2017 quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos;
- Caracterizar as estirpes de *Salmonella Choleraesuis* isoladas de suínos entre 2015 e 2017 pelo polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP);
- Confrontar os perfis genotípicos com os dados epidemiológicos.

4 MATERIAL E METODO

4.1 Material

Foram avaliadas 93 estirpes de *Salmonella enterica* provenientes de 35 animais oriundos de sete granjas de suínos dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais obtidas durante os anos de 2015, 2016 e 2017. As estirpes foram isoladas de animais apresentando septicemia, a partir da avaliação de amostras de pulmão, baço, fígado, rins, linfonodos e intestinos. O material foi coletado e enviado sob refrigeração ao Laboratório de Sanidade Suína– VPS-FMVZ- USP.

4.2 Isolamento e caracterização das estirpes bacterianas

4.2.1 Isolamento bacteriano

O isolamento das estirpes estudadas foi realizado a partir de fragmentos de pulmão, baço, fígado, rins, linfonodos e/ou intestinos. O material foi semeado diretamente em placas contendo ágar MacConkey, Chromagar *Salmonella*, ágar XLT4, e em caldo tetracionato com iodo, incubados em aerobiose a 37° C por 24 h. Após a incubação, uma alíquota do caldo tetracionato foi semeada em ágar MacConkey, Chromagar *Salmonella* e ágar XLT4 e incubada em aerobiose a 37° C por 24 h. As colônias com morfologia sugestiva de *Salmonella enterica* foram selecionadas para identificação pela espectrometria de massa MALDI-TOF.

4.2.2 Identificação por MALDI-TOF MS

Uma alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano em caldo BHI foi centrifugada por 2 minutos em velocidade de 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado mantendo somente o sedimento, o qual foi suspenso em 300 µL de água ultrapura. O sedimento foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi suspenso em 300 µL de água ultrapura e misturado com auxílio de pipeta para homogeneizar completamente a cultura bacteriana na água ultrapura. Foi adicionado 900 µL de etanol absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ao microtubo. A amostra foi centrifugada em velocidade de 13.000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Após estas etapas o tubo foi mantido em temperatura ambiente por, aproximadamente, 1 hora para secagem do sedimento. Após a secagem foi adicionado 30 µL de ácido fórmico 70% e 30 µL de acetonitrila 100%, a amostra foi misturada no vortex e centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenante (50 µL) foi transferido microtubo novo e foi armazenado a -20°C.

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik). Para leitura 1 µL de suspensão proteica foi transferida para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 µL da matrix (*α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*). Cada estirpe foi distribuída em três poços (triplicata). Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX.

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Desta comparação de presença/ausência de picos

específicos por gênero e espécie bacteriana, obtém-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

4.3 Identificação do sorovar

As estirpes identificadas como *Salmonella enterica* foram submetidas à extração de DNA e a identificadas quanto ao sorovar pela PCR.

4.3.1 Extração de DNA

A extração foi realizada segundo descrito por (BOOM et al., 1990) a partir de 1 ml de cultura bacteriana em caldo BHI. A cultura foi centrifugada durante 5 minutos em velocidade de 12.800 rpm para formação do sedimento e descarte do sobrenadante. O sedimento recebeu 1mL de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 ml EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H₂O ultrapura), 40 μ L de solução carreadora (1 g de *Diatomaceous Earth*, 50 μ L HCl 37 % e 5 mL H₂O ultrapura) e o microtubo foi agitado em vortex e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a lise celular e a ligação do material genético as partículas de sílica, a amostra foi centrifugada a 12800 rpm por 90 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeiras com 500 μ L de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H₂O ultrapura), as duas seguintes com 500 μ L de etanol 70 % (-20° C) e a última com 500 μ L de acetona. Após as lavagens, o microtubo contendo o sedimento foi

mantido em estufa a 37 °C por 45 minutos até ficar sem resíduos de acetona. O sedimento foi suspenso em 165 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H₂O ultrapura) e mantido a 56°C durante 10 minutos. Após este período o material foi centrifugado a 12800 rpm por 7 minutos. Nesta última etapa o sobrenadante contendo o DNA foi removido e transferido para um microtubo limpo, o qual foi armazenado a –20 °C até sua utilização.

4.3.2 Amplificação do DNA

Para identificação do sorovar foram usados os *primers* descritos no Quadro 1. Para a reação em cadeia pela polimerase foi adicionado ao microtubo 20 pmoles de cada *primer*, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL.

Para amplificação do fragmento de DNA o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de 95° C por 1 minuto, 57° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto e um ciclo final de 72° C por 5 minutos. À cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

Quadro 1- Sequências de *primers* utilizadas para identificação do sorovar *Salmonella Choleraesuis*

Sorovar	Primer	Sequência	Fragmento (pb)
Choleraesuis¹	FlinC-F	AAG GAA AAG ATC ATG GCA CAA	900
	FlinC-R	GAA CCC ACC ATC AAT AAC TTT G	

1- Chiu et al. (2005).

4.3.3 Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação da PCR foi realizada através da eletroforese em gel de Agarose (1,5%), corado com BlueGreen® (LGC Biotecnologia), utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA). As imagens foram capturadas sob iluminação UV pelo sistema Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories). Os fragmentos foram identificados com base no marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder* (New England BioLabs Inc).

4.4 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III (New England BioLabs Inc). A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 90V durante 3 horas. Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *Ladder* (New England BioLabs Inc).

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados (AFLP) foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). Um dendrograma foi construído utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ponto de corte de 90 % de similaridade genética foi utilizado para determinação e análise dos agrupamentos obtidos (VAN BELKUM et al., 2007).

4.5 Perfil de resistência a antimicrobianos

Os perfis de resistência a antimicrobianos das estirpes estudadas foram analisados por meio da microdiluição em caldo conforme padrões definidos no documento VET01S-CLSI (2015). A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se o painel de antimicrobianos composto por: ampicilina, ceftiofur, penicilina, doxiciclina, oxitetraciclina, marbofloxacina, enrofloxacina, florfenicol, espectinomicina, gentamicina, neomicina, sulfadimetoxina, trimetoprima/sulfametoxazol, clindamicina, tilosina, tilmicosina, tulatromicina, tiamulina. A Figura 1 ilustra a disposição e as concentrações dos respectivos antimicrobianos testados na microplaca.

Para a preparação do inóculo, as estirpes de foram cultivadas em caldo BHI (Difco) incubado a 37° C por 24 horas. A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril (0,9 %) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,150 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada possui aproximadamente 1 a 2 X 10⁸ UFC/mL.

Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1: 1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco), de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, 5 x 10⁵ UFC/mL. 50 µL desta suspensão foram então distribuídos em cada poço da microplaca. Após a distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo estéril e incubada a 37 °C por 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TIO 8	TIA 32	DOX 8	OXI 8	MAR 4	AMP 16	PEN 1	SPE 128	TYL 4	TUL 4	SXT 2/38	SUL 256
B	TIO 4	TIA 16	DOX 4	OXI 4	MAR 2	AMP 8	PEN 0,5	SPE 64	TYL 2	TUL 2	CLIN 8	ENO 4
C	TIO 2	TIA 8	DOX 2	OXI 2	MAR 1	AMP 4	PEN 0,25	SPE 32	TYL 1	TUL 1	CLIN 4	ENO 2
D	TIO 1	TIA 4	DOX 1	OXI 1	MAR 0,5	AMP 2	PEN 0,12	SPE 16	TYL 0,5	TIL 64	CLIN 2	ENO 1
E	TIO 0,5	TIA 2	DOX 0,5	OXI 0,5	MAR 0,25	AMP 1	NEO 32	SPE 8	TUL 64	TIL 32	CLIN 1	ENO 0,5
F	TIO 0,25	TIA 1	TIA 0,5	GEN 1	MAR 0,12	AMP 0,5	NEO 16	TYL 32	TUL 32	TIL 16	CLIN 0,5	ENO 0,25
G	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	MAR 0,06	AMP 0,25	NEO 8	TYL 16	TUL 16	TIL 8	CLIN 0,25	ENO 0,12
H	FLOR 8	FLOR 4	FLOR 2	FLOR 1	FLOR 0,5	FLOR 0,25	NEO 4	TYL 8	TUL 8	TIL 4	POS	POS

Figura 2: Distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para a realização da microdiluição em caldo.

Concentração de antimicrobianos em µg/mL. AMP - Ampicilina, TIO - Ceftiofur, PEN - Penicilina, DOX - Doxícilina, OXI - Oxitetraclina, MAR - Marbofloxacina, ENO - Enrofloxacina, FLOR - Florfenicol, SPE - Espectinomicina, GEN - Gentamicina, NEO - Neomicina, SUL - Sulfadimetoxina, SXT – Trimetoprima / sulfametoxazol, CLIN - Clindamicina, TYL - Tilosina, TIL - Tilmicossina, TUL - Tulatromicina, TIA – Tiamulina, POS - positivo (apenas crescimento bacteriano).

As concentrações inibitórias mínimas foram aferidas visualmente como as menores contrações dos antimicrobianos nos poços sem crescimento bacteriano (sem a formação de botão). Foram utilizadas como controles internos de qualidade as estirpes *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, conforme preconizado pelo documento VET01S-CLSI (2015).

5 RESULTADOS

Foram avaliadas 93 estirpes caracterizadas como *Salmonella Choleraesuis* pela PCR. A distribuição destas estirpes de acordo com o ano de isolamento, de acordo com o órgão de isolamento e de acordo com os Estados de origem dos animais é apresentada nas figuras 2, 3 e 4 respectivamente. As características das estirpes são descritas em detalhes na Tabela 1.

Figura 3 - Distribuição das 93 estirpes de *Salmonella Choleraesuis* de acordo com o ano de isolamento.

Figura 4 - Distribuição das 93 estirpes de *Salmonella Choleraesuis* de acordo com o ano de isolamento

Figura 5 - Distribuição das 93 estirpes de *Salmonella Choleraesuis* de acordo com o Estado de isolamento.

Tabela 1 – Dados de origem e isolamento das 93 estirpes de *Salmonella* Choleraesuis incluídas no estudo.

Estirpe	Órgão	Granja	Animal	Estado	Ano
SC01	Pulmão	H1	A1	SP	2015
SC02	Pulmão	H1	A1	SP	2015
SC03	Pulmão	H1	A2	SP	2015
SC04	Pulmão	H1	A2	SP	2015
SC05	Pulmão	H1	A2	SP	2015
SC06	Intestino	H2	A3	PR	2015
SC07	Baço	H2	A3	PR	2015
SC08	Pulmão	H2	A3	PR	2015
SC09	Pulmão	H2	A4	PR	2015
SC10	Pulmão	H2	A4	PR	2015
SC11	Pulmão	H2	A5	PR	2015
SC12	Pulmão	H2	A5	PR	2015
SC13	Pulmão	H2	A6	PR	2015
SC14	Pulmão	H2	A6	PR	2015
SC15	Pulmão	H2	A7	PR	2015
SC16	Pulmão	H2	A7	PR	2015
SC17	Baço	H2	A4	PR	2015
SC18	Baço	H2	A4	PR	2015
SC19	Fígado	H2	A4	PR	2015
SC20	Fígado	H2	A4	PR	2015
SC21	Baço	H2	A6	PR	2015
SC22	Baço	H2	A6	PR	2015
SC23	Rim	H2	A6	PR	2015
SC24	Rim	H2	A6	PR	2015
SC25	Baço	H2	A8	PR	2016
SC26	Baço	H2	A8	PR	2016
SC27	Baço	H2	A9	PR	2016
SC28	Baço	H2	A9	PR	2016
SC31	Pulmão	H3	A10	MG	2016
SC32	Pulmão	H3	A10	MG	2016
SC33	Baço	H3	A10	MG	2016
SC34	Baço	H3	A10	MG	2016
SC35	Fígado	H3	A10	MG	2016
SC36	Fígado	H3	A10	MG	2016
SC37	Rim	H3	A10	MG	2016
SC38	Rim	H3	A10	MG	2016
SC39	Baço	H3	A11	MG	2016
SC40	Baço	H3	A11	MG	2016
SC41	Pulmão	H3	A11	MG	2016
SC42	Pulmão	H3	A11	MG	2016
SC43	Pulmão	H3	A12	MG	2016
SC44	Pulmão	H3	A12	MG	2016
SC45	Baço	H3	A13	MG	2016
SC46	Baço	H3	A13	MG	2016
SC47	Baço	H3	A14	MG	2016
SC48	Baço	H3	A14	MG	2016

Continuação...

Estirpe	Órgão	Granja	Animal	Estado	Ano
SC49	Fígado	H3	A14	MG	2016
SC50	Fígado	H3	A14	MG	2016
SC51	Intestino	H3	A14	MG	2016
SC52	Baço	H4	A15	SC	2016
SC53	Baço	H4	A15	SC	2016
SC54	Baço	H4	A16	SC	2016
SC55	Baço	H4	A16	SC	2016
SC56	Pulmão	H4	A16	SC	2016
SC57	Pulmão	H4	A16	SC	2016
SC58	Baço	H4	A17	SC	2016
SC59	Baço	H4	A17	SC	2016
SC60	Pulmão	H4	A18	SC	2016
SC61	Pulmão	H4	A18	SC	2016
SC62	Pulmão	H5	A19	MG	2016
SC63	Pulmão	H5	A19	MG	2016
SC64	Baço	H5	A19	MG	2016
SC65	Baço	H5	A19	MG	2016
SC66	Fígado	H5	A19	MG	2016
SC67	Fígado	H5	A19	MG	2016
SC68	Pulmão	H6	A20	PR	2016
SC69	Pulmão	H6	A21	PR	2016
SC70	Pulmão	H6	A22	PR	2016
SC71	Pulmão	H6	A23	PR	2016
SC72	Pulmão	H6	A24	PR	2016
SC73	Baço	H6	A20	PR	2016
SC74	Baço	H6	A25	PR	2016
SC75	Baço	H6	A21	PR	2016
SC77	Pulmão	H7	A26	MG	2017
SC78	Pulmão	H7	A27	MG	2017
SC79	Pulmão	H7	A28	MG	2017
SC80	Linfonodo	H7	A29	MG	2017
SC81	Linfonodo	H7	A31	MG	2017
SC82	Fígado	H7	A29	MG	2017
SC83	Baço	H7	A29	MG	2017
SC84	Fígado	H7	A30	MG	2017
SC85	Fígado	H7	A31	MG	2017
SC86	Baço	H7	A31	MG	2017
SC87	Rim	H7	A31	MG	2017
SC88	Rim	H7	A29	MG	2017
SC89	Pulmão	H7	A32	MG	2017
SC90	Pulmão	H7	A33	MG	2017
SC91	Pulmão	H7	A33	MG	2017
SC92	Baço	H7	A34	MG	2017
SC93	Rim	H7	A34	MG	2017
SC94	Fígado	H7	A34	MG	2017
SC95	Baço	H7	A35	MG	2017
SC96	Fígado	H7	A35	MG	2017

Tabela 3 - Variação da CIM, CIM 50, CIM 90 e taxas de resistência de *Salmonella* Choleraesuis contra os antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	Variação CIM (µg/mL)	CIM 50 (µg/mL)	CIM90 (µg/mL)	Resistencia % (n=93)	Pontos de corte		
					Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	0,25 - 16	>16	>16	92,5 (86/93)	≤ 0.25	0,5	≥ 1
Ceftiofur	0.25 – 8	1	1	0 (0/93)	≤ 2	4	≥ 8
Penicilina	0.12 – 1	>1	>1	100 (93/93)	≤ 0,12	-	≥0,25
Doxiciclina	0.5 - 8	> 8.0	> 8.0	100 (93/93)	≤ 0,5	1	≥ 2
Oxitetraciclina	0.5 - 8	> 8.0	> 8.0	98,9 (92/93)	≤ 0,5	1	≥ 2
Marbofloxacina	0.06 - 4	1	1	1,1 (1/93)	≤ 1	2	≥ 4
Enrofloxacina	0.12 - 4	1	1	18,3 (17/93)	≤ 0. 5	1-2	≥ 4
Florfenicol	0.25 - 8	> 8.0	> 8.0	82,8 (77/93)	≤ 4	8	≥ 16
Espectinomicina	8 - 128	64	> 128	24,7 (23/93)	≤ 32	64	≥ 128
Gentamicina	1 - 16	>16	>16	93,5 (87/93)	≤ 2	4	≥ 8
Neomicina	4 - 32	8	16	10,8 (10/93)	≤ 8	-	-
Sulfadimetoxina	256	> 256	> 256	100 (93/93)	≤ 256	-	≥512
Trimetoprima / sulfametoxazol	2/38	≤2/38	> 2/38	22,6 (21/93)	≤ 2/38	-	≥4/76
Clindamicina	0.25 - 8	> 8	> 8	100 (93/93)	≤ 0.25	0,5	≥ 1
Tilosina	0.5 - 32	> 32	> 32	100 (93/93)	≤ 1	2	≥ 4
Tilmicosina	4 - 64	> 64	> 64	100 (93/93)	≤ 8	16	≥ 32
Tulatromicina	1 - 64	64	> 64	73,1 (68/93)	≤ 16	32	≥ 64
Tiamulina	0.5 - 32	> 32	> 32	100 (93/93)	≤ 16	-	≥ 32

Figura 6 - Distribuição das 93 estirpes de *Salmonella Choleraesuis* de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos.

Tabela 4- Perfis de resistência observados dentre as 93 estirpes de *Salmonella* Choleraesuis testadas.

Perfil	Antimicrobianos	N de estirpes
R1	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, MAR, ENO, SDM, GEN, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	1
R2	PEN, DOX, OXI, SDM, ENO, TYLT, TIL, TIA, CLI	1
R3	PEN, DOX, OXI, SDM, GEN, TYLT, TIL, TIA, CLI	1
R4	PEN, DOX, SDM, TYLT, TIL, TIA, CLI	1
R5	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, ENO, SDM, GEN, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	2
R6	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, SDM, GEN, SPE, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	2
R7	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, SDM, STX, GEN, SPE, TYLT, TIL, TIA, CLI	2
R8	PEN, AMP, DOX, OXI, SDM, TYLT, TIL, TIA, CLI	2
R9	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, ENO, SDM, STX, GEN, NEO, SPE, TYLT, TIL, TIA, CLI	4
R10	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, ENO, SDM, STX, GEN, SPE, TYLT, TIL, TIA, CLI	4
R11	PEN, DOX, OXI, SDM, TYLT, TIL, TIA, CLI	4
R12	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, ENO, SDM, STX, GEN, SPE, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	5
R13	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, SDM, GEN, NEO, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	6
R14	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, SDM, GEN, STX, GEN, SPE, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	6
R15	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, SDM, GEN, TYLT, TIL, TIA, CLI	6
R16	PEN, AMP, DOX, OXI, SDM, GEN, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	7
R17	PEN, AMP, DOX, OXI, FFN, SDM, GEN, TUL, TYLT, TIL, TIA, CLI	39

A análise das 93 estirpes pelo AFLP mostrou uma alta similaridade entre os isolados, sendo as 93 estirpes agrupadas em um único perfil com mais de 90% de similaridade. O perfil de resistência discriminou as estirpes em 17 agrupamentos enquanto o AFLP reuniu as estirpes em um único genótipo.

Figura 7- Distribuição das 93 estirpes de *Salmonella Choleraesuis* de acordo com o perfil genotípico pelo AFLP.

6 DISCUSSÃO

Casos de infecção septicêmica por *Salmonella* Choleraesuis foram descritos pela primeira vez no Brasil em 1991 (BARCELOS et al., 1991). Desde então não há na literatura pesquisada relatos ou descrições sobre a ocorrência deste sorovar ou estudos caracterizando estirpes isoladas de animais doentes. A partir dos exames realizados no Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP e através de informações obtidas com diferentes laboratórios de diagnósticos que atuam em suinocultura é possível verificar que a partir de 2005 começaram a surgir novos casos de septicemia causada por este sorovar em diferentes rebanhos, aumentando os relatos informais a partir de 2013. O presente estudo apresenta uma amostragem referente aos anos de 2015 a 2017, obtidas a partir do acompanhamento de sete sistemas de produção de suínos e do exame de 35 animais com quadro clínico de septicemia.

A partir dos órgãos de isolamento das estirpes é possível verificar que os pulmões foram os órgãos mais afetados pelo agente, seguido pelo baço, fígado e rins. Os linfonodos mesentéricos e os intestinos são os locais de menor taxa de isolamento do agente, o que corrobora com as lesões frequentemente descritas para os quadros septicêmicos da doença (CARLSON et al., 2012).

A avaliação do perfil de resistência das estirpes isoladas revelou que todas as 93 estirpes foram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). Todas as estirpes foram resistentes à penicilina, doxiciclina, sulfadimetoxina, clindamicina, tilosina, tilmicosina e tiamulina. Altas taxas de resistência a oxitetraciclina (98,9 %), ampicilina (92,5 %), gentamicina (93,5 %) e florfenicol (82,8 %) também foram observadas.

Outros estudos indicam altas taxas de resistência em estirpes do sorovar *Choleraesuis*. Chang et al. (2005) avaliando 157 estirpes de origem suína observaram alguns índices semelhantes, descrevendo 96 % de resistência a ampicilina, 97 % de resistência a tetraciclina, 99 % de resistência a cloranfenicol (pertencente a mesma classe do florfenicol) e 48 % de resistência a gentamicina.

Wang et al. (2006) avaliaram estirpes do sorovar *Choleraesuis* isoladas a partir de casos de septicemia em pacientes humanos em internação hospitalar e identificaram em 87 estirpes, 97,4 % de resistência a ampicilina, 92 % de resistência a cloranfenicol, 77 % de resistência a trimetoprima com sulfametoxazol, e o que mais chamou a atenção dos autores foi a taxa de resistência de 59 % a ciprofloxacina, muito utilizada para o controle desta infecção em humanos. No presente estudo, os antimicrobianos da classe das fluorquinolonas avaliados foram enrofloxacina (18,3 % de resistência) e marbofloxacina (1,1 % de resistência).

O sorovar *Choleraesuis* tem sido descrito como o segundo sorovar mais prevalente em casos de salmonelose humana em Taiwan e o 11º na Tailândia; fora dos países asiáticos, a ocorrência de infecções por este sorovar em humanos não é tão frequente (XIE et al., 2015). Talvez por este motivo nenhum dos estudos identificados na literatura utiliza o mesmo grupo de antimicrobianos do presente estudo, direcionado para os princípios ativos mais usados no tratamento das doenças em suínos, uma vez que o enfoque dos estudos citados muitas vezes é o impacto do sorovar para a saúde humana.

Deste modo não é possível avaliar o real significado da alta frequência de resistência das estirpes estudadas as classes dos macrolídeos (tilosina, tilmicosina), diterpenos (tiamulina) e triamilídeos (tulatromicina). Alguns destes ativos são indicados para o tratamento dos quadros de pneumonia e podem estar sendo indicados erroneamente nestes casos em que há septicemia com pneumonia pelo

sorovar *Choleraesuis*.

As estirpes foram classificadas em 17 perfis de resistência aos antimicrobianos e, como pode ser observado no dendrograma, os perfis apresentam uma tendência em se agrupar segundo as propriedades de origem. O AFLP não foi capaz de discriminar as 93 estirpes que foram reunidas em um único perfil; este fato indica que pode haver uma origem comum entre as estirpes que estão circulando nos diferentes rebanhos dentre os Estados avaliados. Os rebanhos estudados não apresentavam uma origem de reprodutores comum.

A caracterização genotípica de estirpes de *Salmonella* *Choleraesuis* pela eletroforese em campo pulsado (PFGE) com a enzima *XbaI* é descrita por Sirichote et al. (2010) na Tailândia, por Pedersen et al. (2015) na Dinamarca, e por Xie et al. (2015) na China. Estes autores descrevem a discriminação das estirpes avaliadas em diferentes pulsotipos, mostrando que existe variabilidade dentro do sorovar *Choleraesuis*. Alguns estudos comparando o AFLP com a enzima *Hind* III com a PFGE sugerem que ambas as técnicas têm poder discriminatório similares analisando estirpes de *Salmonella* (Giammanco et al., 2007; Zucon, 2008). Estes dados reforçam a alta similaridade das estirpes do presente estudo. A variação de resistência observada neste caso pode estar ocorrendo apenas pela troca de elementos móveis que provavelmente não impactaram nos perfis obtidos pelo AFLP.

7 CONCLUSÕES

As estirpes de *Salmonella* Choleraesuis avaliadas no presente estudo apresentaram altas taxas de resistência aos antimicrobianos frequentemente utilizados em suinocultura, sendo todas multirresistentes.

Todas as estirpes foram reunidas em um único perfil pelo AFLP com mais de 94% de similaridade e o perfil de resistência discriminou melhor as estirpes agrupando as mesmas de acordo com as granjas de origem.

8 REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>. Acesso: 10 Novembro, 2017
- BARCELLOS, D.E.S.N., RODRIGUES, N.C., MIGLIAVACCA, F., OLIVEIRA, S.J., BOROWSKI, S. Ocorrência de salmonelose septicêmica em suínos no período neonatal. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, 19, p. 41-44, 1991
- BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, MM.; JANSEN, CL.; WERTHEIM-VAN DILLEN, PM.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal Clinical Microbiology**. v. 28, p.495-503, 1990.
- BRENNER, F.W. VILLAR, R.G, ANGULO, F. J., TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature **Journal Clinical Microbiology** v.38, n.7, p- 2465-2467, 2000.
- CARLSON STEVEN A., ALISON E. BARNHILL, AND RONALD W. GRIFFITH. Salmonellosis. **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: The Iowa State University, 2012. p. 821-32
- CASTILLO, A.C.G., MARTINEZ, L.H.P., APODACA, N.L.C. Salmonellosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo **Veterinaria México**, v.39, n.1, p. 81-90, 2008
- CHIU, C., SU, L., & CHU, C. (2004). Salmonella enterica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment Salmonella enterica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment †. **Clinical Microbiology Reviews**, 17(2), 311–322. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.311>
- CHIU, T.-H.; PANG, J.-C.; HWANG, W.-Z.; TSEN, H.-Y. Development of PCR primers for the detection of Salmonella enterica sorovar Choleraesuis based on the fliC gene. **Journal of food protection**, v. 68, n. 8, p. 1575–80, 2005. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria Isolated from Animals; **Approved Standard- 3rd Ed.** CLSI supplement VET01S- (2015).
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**. v.17, p. 368–376, 1981.
- FERDOKA-CRAY, P.J. WHIPP, S.C; ISAACSON, R.E.; NORD, N; LAGER K. Transmission of Salmonella typhimurium to swine. **Veterinary of Microbiology**, v. 41, p. 333- 344, 1994
- FERDOKA-CRAY, P.J; HOOG, A.; GRAY, J.T; LORENZEN, K.; VELAZQUES, J.; VON BOHREN, P. Feed and feed trucks as sources of Salmonella contamination in swine. **Swine Health Production**, v.5, p- 189-193, 1997

Giammanco, G. M., Mammina, C., Romani, C., Luzzi, I., Dionisi, A. M., & Nastasi, A. (2007). Evaluation of a modified single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) technique for subtyping *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Research in Microbiology**, 158(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.10.004>

GUEDES, R.M.C., PEREIRA C.E.R., RESENDE T.P. Infecção por *Salmonella choleraesuis*: epidemiologia, sinais clínicos e patologia da doença. **Anais do X SINSUI Simpósio Internacional de Suinocultura**, p.141-148, 2017.

KICH, D.J., MENEGGUZZI, M., REICHEN, C. Salmonelose clínica em suínos no Brasil - diagnóstico e controle. **Anais do X SINSUI Simpósio Internacional de Suinocultura**, p.149-162, 2017

MAGIORAKOS, A.P., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., CARMLI, Y., FALAGAS, M. E., GISKE, C. G., MONNET, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MATAYOSHI, M., KITANO, T., SASAKI, T., & NAKAMURA, M. (2015). Resistance phenotypes and genotypes among multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* strains isolated between 2008 and 2012 from slaughter pigs in Okinawa Prefecture, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, 77(6), 705–710. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0683>

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

P. A. Grimont & F. X. Weill, Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars, **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Institut Pasteur, Paris, France, 2007

RYAN, M. P., O'DWYER, J., & ADLEY, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed Research International**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>

SIRICHOTE, P., HASMAN, H., PULSIRIKARN, C., SHONHEYDER, H.C., SAMULIONIENE, J., PORNRUANGMONG, S., BANGTRAKULNONT, A., AERSTRUP, F.M., HENDRIKSEN, R.S. Molecular Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporinase-Producing *Salmonella enterica* Serovar *Choleraesuis* Isolates from Patients in Thailand and Denmark. **Journal Clinical Microbiology**. v.48, n.3, p. 883-888, 2010

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**.v.28,p. 2731-2739, 2011

THOMPSON, JD.; HIGGINS, DG.; GIBSON, TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**,v. 22,p. 4673-4680,1994

TWOMEY, D. F.; CARSON, T.; FOSTER, G.; KOYLASS, M. S.; WHATMORE, a. M. Phenotypic characterisation and 16S rRNA sequence analysis of veterinary isolates of *Streptococcus pluranimalium*. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 2, p. 236–238, 2012.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, PT.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, NK.; FUSSINGG, V.; GREENH, J.; FEILI, E.; GERNER-SMIDTJ, P.; BRISSEK, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v.13, p.1–46, 2007.

XIE, J., YI, S., ZHU, J., LI, P., LIANG, B., LI, H., SONG, H. (2015). Antimicrobial resistance and molecular investigation of H₂S-negative salmonella enterica subsp. Enterica serovar choleraesuis isolates in China. **PLoS ONE**, 10(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139115>

ZHANG, S., YIN, Y., JONES, M. B., ZHANG, Z., KAISER, B. L. D., DINSMORE, B. A., ... DENG, X. (2015). Salmonella serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, 53(5), 1685–1692. <https://doi.org/10.1128/JCM.00323-15>

Zucon, L. T. S. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. **Univesidade de São Paulo**, 2008