

GIVAGO FARIA RIBEIRO DA SILVA

**Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Haemophilus parasuis*
isoladas de suínos da região Centro-sul do Brasil**



São Paulo
2016

GIVAGO FARIA RIBEIRO DA SILVA

Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos da região Centro-sul do 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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2016

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.3287
FMVZ

Silva, Givago Faria Ribeiro da
Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos da região Centro-sul do Brasil / Givago Faria Ribeiro da Silva. -- 2016.
59 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Haemophilus parasuis*. 2. Sorotipagem. 3. Resistência. 4. MLST. 5. Virulência. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos”, protocolado sob o nº 2579/2012, utilizando 100 (cem) isolados de *Haemophilus parasuis*, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/4/2012.

We certify that the Research “Phenotypic and genotypic characterizatón of *Haemophilus parasuis* strains isolated from swine”, protocol number 2579/2012, utilizing 100 (one hundred) isolates of *Haemophilus parasuis*, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/11/2012.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Givago Faria Ribeiro da

Título: Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos da região Centro-sul do 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. (a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha família Faria, em especial atenção a minha avó Genésia, a minha mãe Naura e a tia Iasmim. Elas e os demais sempre me inspiraram a continuar estudando e serviram como exemplo de como se tornar um cidadão.

"O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A FAPESP, ao CNPQ/CAPES e a USP que propiciaram que este trabalho pudesse ser realizado.

A minha Orientadora, Andrea Micke Moreno, por ter acreditado em um aluno até então desconhecido e que me recebeu entre os seus alunos e laboratório de forma muito cortês e educada e fez de tudo para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido da melhor forma possível.

Ao Dr. Andrea Luppi, do Instituto *Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna* - Sezione di Reggio Emilia pela facilidade e educação com que me atendeu em um congresso afim da contribuição e colaboração nas sorotipificações das mossas amostras.

Aos meus amigos de laboratório: Paula, Jucelia, Alexandre, Rosi, Taís, Fabiana, Roberta, Vasco, Pedro, Bárbara, Maria, Mirela, Gabriela, Luiza, Carlos e todos os estagiários que passaram pelo laboratório de sanidade suína e que contribuíram, nem que seja apenas pela companhia no laboratório, para que esse trabalho fosse realizado.

A minha amiga Ketrin que sempre me entendeu e participou de forma diferenciada em nossas conversas sobre ciência ou qualquer assunto que pudéssemos tratar.

Aos meus amigos Bruno, Daniel, Diego e Luana que sempre foram um diferencial em minha vida e que sempre estiveram presentes durante esta caminhada pela pós-graduação.

À todos os colegas, amigos, professores e funcionários dos VPS que contribuíram direta ou indiretamente ao desenvolvimento deste trabalho agradeço pela contribuição.

RESUMO

SILVA, G. F. R. da. **Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos da região Centro-sul do Brasil.** [Phenotypic and molecular characterization of *Haemophilus parasuis* strains isolated from pigs in the Center- South of Brazil]. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Haemophilus parasuis é o agente etiológico da Doença de Glässer, que causa artrite, pneumonia, meningite e poliserosite em suínos e tem assumido grande importância na suinocultura moderna, uma vez que sua ocorrência tem aumentado significativamente nos últimos anos em rebanhos afetados pelo circovirus suíno tipo 2. No presente estudo foram avaliadas 117 amostras de *H. parasuis* isoladas dentre os anos de 2009 a 2014, isoladas de suínos de diferentes estados do da região Centro-Sul do Brasil. As estirpes foram submetidas à sorotipificação, confirmação do gênero/espécie pela PCR, o perfil de resistência a antimicrobianos foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi realizada a caracterização genotípica das amostras por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e por sequenciamento de múltiplos sítios (multilocus sequence typing - MLST) e a presença de genes de virulência *vtaA* foi analisada. Os sorotipos mais frequentes foram: 4 (21,3%), seguido do 5 (12,9%), do 13 (9,4%), do 14 (7,7%) e do sorotipo 1 (1,7%), e em alguns casos mais de um sorotipo foi identificado na mesma granja e até no mesmo animal, resultado este parecido ao encontrado no restante do mundo. Em todas as amostras o gene *vtaA* estava presente, para alguns antibióticos os índices de resistência foram elevados, como para tilosina (98,29%), danofloxacina (95,72%), sulfadimetoxina (88,03%), penicilina (77,7%) e a multirrestencia atingiu o índice alarmante de 93,16% das estirpes. Foram identificados 67 perfis diferentes no PFGE e das 9 amostras analisadas pelo MLST foram identificados novos STs, até então, não descritos mundialmente. Quando os novos STs foram comparados com os previamente descritos, estas se dispersaram entre as descritas em diferentes países. Neste estudo foi possível observar que as estirpes de *H. parasuis* brasileiras possuem alta variabilidade, tanto nos sorotipos, perfis de resistência, análises genômicas de PFGE e MLST.

Palavras-chave: *Haemophilus parasuis*. Sorotipagem. Resistencia. MLST. Virulência.

ABSTRACT

SILVA, G. F. R. da. **Phenotypic and molecular characterization of *Haemophilus parasuis* strains isolated from pigs in the Center- South of Brazil.** [Caracterização fenotípica e molecular de estirpes de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos da região Centro-sul do Brasil]. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Haemophilus parasuis is the etiological agent of Glässer disease that causes arthritis, pneumonia, meningitis and polyserositis in pigs and has assumed great importance in modern swine production, since its occurrence has increased significantly in recent years in herds affected by porcine circovirus type 2. In the present study 117 strains of *H. parasuis* isolated between 2009 to 2014 were utilized, isolated from pigs of south center of Brazil. The strains were serotyping, confirmed genus/species by PCR, the antimicrobial resistance profile was evaluated determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and strains were genotypically characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) and presence of *vtA* virulence gene. The major serotypes identified were 4 (21.3%), 5 (12.9%), 13 (9.4%), 14 (7.7%) and at last the 1 (1.7%), In some cases more than one serotype was identified in the same farm and in the same animal, this results were identified in others parts of the world. All samples had *vtA* gene. The resistance for some antibiotics was high for tylosin (98.29%), danofloxacin (95.72%) sulfadimetoxin (88.03%), and penicillin (77.7%). Multidrug resistance rates reached 93.16% of the samples. A total of 67 different profiles were identified in PFGE and nine samples were analyzed by MLST. All nine strains tested were identified as new STs. When these strains were compared with MLST database, they were dispersed among the strains from other countries. In this study, it was clear that the Brazilian *H. parasuis* strains are highly variable considering serotypes, resistance profiles, genomic analysis of PFGE and MLST.

Keywords: *Haemophilus parasuis*. Serotyping. Resistance. MLST. Virulence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição dos Isolados de <i>H. parasuis</i> do banco de amostras do Laboratório de Sanidade Suína-VPS-FMVZ/USP.....	25
Tabela 2 -	Distribuição dos Isolados de <i>H. parasuis</i> do banco de amostras do Laboratório de Sanidade Suína-VPS-FMVZ/USP e sorotipos identificados.....	33
Tabela 3 -	Frequência de estirpes resistentes aos antimicrobianos testados de acordo com as diferentes classes avaliadas.....	36
Tabela 4 -	Distribuição dos valores de MIC obtidos dentre as 117 estirpes avaliadas, valores de MIC50, MIC90 e frequência de estirpes resistentes.....	38
Tabela 5 -	Frequência de estirpes de <i>H. parasuis</i> apresentando multirresistência aos antimicrobianos testados.....	39
Tabela 6 -	Frequência de estirpes de <i>H. parasuis</i> apresentando multirresistência aos antimicrobianos testados.....	46
Tabela 7 -	Distribuição do perfil de resistência aos antimicrobianos de <i>H. parasuis</i> isolados no Brasil, Espanha, Reino Unido e China realizados por concentração inibitória mínima.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição das granjas em que foram isoladas as estirpes de <i>H. parasuis</i> ao longo dos anos de 2009 a 2014.....	24
Figura 2 - Distribuição das 117 cepas de <i>H. parasuis</i> de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos	39
Figura 3 - Dendrograma gerado a partir da análise pelo PFGE de 76 estirpes de <i>H. parasuis</i> com a enzima RsrII	41
Figura 4 - Representação gráfica da distribuição das cepas brasileiras de <i>H. parasuis</i> em comparação com as cepas caracterizadas através do MLST em todo o mundo (As cepas nacionais são representadas em verde com a numeração de 167 a 175)	42
Figura 5 - Dendrograma apresentando a distribuição das cepas brasileiras de <i>H. parasuis</i> em comparação com as cepas caracterizadas através do MLST em todo o mundo. As cepas nacionais são representadas em vermelho e identificadas com a numeração dos STs identificados. (Continua)	43
Figura 6 - Dendrograma apresentando a distribuição das cepas brasileiras de <i>H. parasuis</i> em comparação com as cepas caracterizadas através do MLST em todo o mundo. As cepas nacionais são representadas em vermelho e identificadas com a numeração dos STs identificados. (Conclusão)	44
Quadro 1 - Critérios utilizados para avaliação dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	28
Quadro 2 - Sequência dos oligonucleotídeos que foram empregados na identificação do agente e na detecção dos genes de virulência <i>vtaA</i>	28
Quadro 3 - Sequência dos oligonucleotídeos que serão empregados na amplificação dos genes empregados no MLST.....	31
Gráfico 1 - Frequência de sorotipos identificados nas 117 estirpes de <i>H. parasuis</i> avaliadas..	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Histórico	14
2.2	Etiologia	14
2.3	Epidemiologia	15
2.5	Tratamento e Resistência	17
2.6	Métodos de identificação e tipificação	18
3	OBJETIVOS	22
4	MATERIAL E METODO	23
4.1	Amostras	23
4.2	Sorotipagem	23
4.4	Extração de DNA	28
4.5	Reação em cadeia pela polimerase	28
4.6	Eletroforese em campo pulsado - PFGE	30
4.7	Análise estatística da PFGE	30
4.8	Amplificação dos genes empregados no MLST	31
4.9	Sequenciamento	32
4.10	Análise dos dados do MLST	32
4.11	Análise Filogenética	32
5	RESULTADOS	33
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo, representando quase metade do consumo e da produção geral de carnes. O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína, sendo que a cadeia produtiva em nosso país apresenta um dos melhores desempenhos econômicos do cenário internacional com um aumento expressivo nos volumes, valores produzidos e exportados.

Esse desempenho se deve aos avanços organizacionais e a tecnificação da cadeia suinícola em todo o Brasil, contudo a intensificação da produção leva ao aumento da densidade animal e conseqüente disseminação de vários patógenos causando grandes prejuízos econômicos. As enfermidades respiratórias estão entre os problemas de maior relevância econômica na suinocultura moderna, causando mortalidade de animais, refugagem de leitões, custos com medicamentos e condenações de carcaças nos frigoríficos. Dentre estas enfermidades destaca-se a doença de Glässer, causada pelo *Haemophilus parasuis* caracterizada por pneumonia, artrite, meningite e poliserosite em suínos jovens.

Variações entre as estirpes de *H. parasuis* em relação ao sorotipo, virulência, perfil genotípico e resistência antimicrobiana vem sendo observadas em todo o mundo, no entanto, em nosso país, existe a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o tema. A caracterização do perfil de resistência dos isolados nacionais através da determinação da concentração inibitória mínima será de grande auxílio para os profissionais de campo, uma vez que não existem dados nacionais sobre resistência a antimicrobianos para esta espécie.

A sorotipificação, método tradicional, associada à utilização da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e do sequenciamento de múltiplos sítios (*Multilocus Sequence Typing* - MLST) contribuirá para a caracterização epidemiológica de estirpes nacionais.

Com base em todos os aspectos descritos o presente estudo teve por objetivos gerais a caracterização de estirpes de *H. parasuis* isoladas de diferentes Estados do Brasil e pertencentes a coleção do laboratório de sanidade suína e virologia VPS-FMVZ-USP, através da sorotipificação, identificação dos genes de virulência *vtaA*, determinação do perfil de resistência a antimicrobianos, além da padronização da eletroforese em campo pulsado para caracterização do agente e determinação das STs presentes nesta coleção através do sequenciamento de múltiplos sítios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Glässer em 1910 relatou pela primeira vez a associação de quadros de pericardite, pleuresia serofibrinosa, peritonite, artrite e meningite em suínos com um pequeno bastonete gram-negativo, doença posteriormente reproduzida experimentalmente por vários grupos de pesquisadores e denominada Doença de Glässer (BIBERSTIEN; WHITE, 1969; LITTLE, 1970).

Inicialmente o agente foi denominado *Haemophilus suis*, que requeria o fator V ou NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e o fator X (hemina ou outra profirina) como cofatores para o crescimento, entretanto a necessidade do cofator X foi descartada reclassificando o agente para *Haemophilus parasuis* (BIBERSTIEN; WHITE, 1969; LITTLE, 1970). Atualmente a Doença de Glässer tem se tornado uma ameaça frequente para leitões precocemente desmamados e para rebanhos suínos com alto *status* sanitário (CHEN et al., 2009).

2.2 Etiologia

O *H. parasuis* é uma bactéria Gram negativa, imóvel, microaerófila, possui células pleomórficas, variando de um simples pequeno cocobacilo a longas cadeias filamentosas e pertence à família *Pasteurellaceae* (QUINN et al., 1994).

O *H. parasuis* tem o crescimento dificultado, pois necessita de meios de cultura que contenham NAD. Este cofator pode ser obtido em cultivos de ágar sangue de carneiro aquecido (ágar chocolate) ou com a utilização de uma estria de *Staphylococcus aureus* em placa de ágar sangue de carneiro, cuja hemólise liberará o cofator necessário. O crescimento de colônias pequenas, translúcidas e não hemolíticas, circunvizinhas ao *S. aureus*, ocorre entre 24 e 48 horas após incubação a 37° C demonstrando o fenômeno de satelitismo (BIBERSTIEN; WHITE, 1969; QUINN et al., 1994; MENIN et al., 2005).

Além das características morfológicas são necessárias as provas bioquímicas para a confirmação do agente. O *H. parasuis* é capaz de utilizar a glicose, sacarose, galactose, manose e frutose e incapaz de utilizar a lactose, manitol e xilose. Apresenta reação negativa para urease, oxidase e indol, não reduz nitratos em nitritos e utiliza a enzima catalase (QUINN et al., 1994).

2.3 Epidemiologia

O *H. parasuis* é um agente distribuído mundialmente que vem tendo um acréscimo em sua importância devido à adoção de novas tecnologias de produção, baseadas em múltiplos sítios de terminação com mesma origem de leitões (RAPP-GABRIELSON 2000). É possível isolar o agente da Doença de Glässer tanto de animais portadores como de animais doentes e a transmissão se dá por aerossóis (OLIVEIRA; PIJOAN, 2004).

É um agente causador de pneumonia, poliserosite e pericardite, contudo pode ser secundário de doenças como a pneumonia enzoótica ou de agentes virais imunossupressores como o circovirus, influenza e vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos causando pneumonia (QUINN et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2003). O *H. parasuis* é um patógeno causador primário de doença nos suínos, porém pode ser frequentemente isolado de animais concomitantemente com infecções virais de caráter imunossupressor, como Circovirose, Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína, Influenza Suína ou doenças bacterianas como a Pneumonia Enzoótica agravando o quadro clínico. Podendo agir desta forma talvez como um agente secundário nestas infecções respiratórias (MOLLER et al, 1993; QUINN et al., 1994; RAPP-GABRIELSON, 1998;). Nestes casos ele pode agir causando quadros mais intensos da doença de Glässer, uma vez que a imunidade do rebanho é um fator preponderante para a infecção do *H. parasuis*, Sobestiansk et al. (1999) identificaram que estirpes avirulentas ao colonizarem animais imunossuprimidos podem voltar a adquirir virulência e a capacidade de induzir a doença.

A Presença de mais de um sorotipo no mesmo rebanho (RAPP-GABRIELSON; GABRIELSON, 1992; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004) e até mesmo no mesmo animal já foi identificada (RAPP-GABRIELSON; GABRIELSON, 1992). Ao longo dos anos vários estudos para a identificação dos sorotipos de *H. parasuis* foram realizados (KIELSTEIN; RAPP-GRABRIELSON, 1992; OLIVEIRA et al., 2003; ANGEN et al., 2004; CAI et al.,

2005; CASTILLA et al., 2011), o sorotipo 4 seguido do 5 (OLIVEIRA et al., 2003; CAI et al., 2005; CASTILLA et al., 2011) ou o inverso, 5 seguido do 4 (KIELSTEIN; RAPP-GRABRIELSON, 1992; ANGEN et al., 2004) têm se demonstrado mais prevalentes.

A capacidade de formação de biofilmes e manutenção das estirpes virulentas e não virulentas de *H. parasuis* nas cavidades nasais dos suínos foi objetivo de estudos de Bell0-Ortí et al. (2014) e eles identificaram que as estirpes não virulentas possuem a capacidade muito mais desenvolvida de formarem biofilmes quando comparadas as virulentas e, ainda segundo os autores, essa capacidade das não virulentas pode indicar o motivo delas persistirem no trato respiratório superior dos suínos enquanto as estirpes virulentas de característica planctônica são mais facilmente levadas mais ao interior dos suínos e difundem-se para mais órgãos.

2.4 Sinais Clínicos e Lesões

De acordo com Vahleet al. (1997) os principais sinais clínicos decorrentes da infecção por *H. parasuis* são febre, letargia, inchaço nas articulações, claudicação, incoordenação motora, tremor, cianose tosse, decúbito lateral e morte súbita. Os primeiros sinais, como febre e letargia são observados apenas 16 horas após a inoculação respiratória, após 60 a 70 horas foram evidenciados descargas nasais mucopurulenta e decúbito lateral e a morte dos animais ocorreu entre 84 e 108 horas após inoculação, isto se deve a rápida capacidade de colonização por sorotipos virulentos quando inoculado em via intranasal quando comparados as cepas não virulentas (VAHLE et al., 1997).

Vahle et al. (1997) e Oliveira e Pijoan (2004) isolaram o *H. parasuis* após 12 horas de inoculação da cavidade nasal e traqueia de suínos e após 36 horas do sangue e tecidos sistêmicos, sendo que os animais desenvolveram os sinais clínicos e lesões típicas da doença. Alguns trabalhos demonstraram que este patógeno coloniza a mucosa nasal precocemente de animais muito jovens, indicando deste modo que este provavelmente seja o primeiro local de colonização do agente.

Apenas os suínos são susceptíveis a infecção por *H. parasuis*. O agente possui tropismo para as membranas serosas, o que leva a polisserosite, ou mesmo a infecções localizadas como peritonite, meningites, artrite, pleurisas e pneumonias. Em casos de septicemia, podem ser encontradas hemorragias puntiformes nos rins. Estes achados podem

ocorrer em várias combinações ou isoladamente e dependendo do animal o fígado e os baços podem estar aumentados de volume. Em lesões de abatedouro, onde os casos crônicos são comumente chegados a ser abatidos, são observadas aderências dos órgãos abdominais ao peritônio e da serosa torácica e a presença de conteúdo fibrino-purulento nas articulações, microscopicamente há inflamação com infiltração de neutrófilos e alguns mononucleares nas serosas afetadas (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Durante a necropsia podem ser observados a presença de exudato fibrinoso, serofibrinoso ou purulento nas membranas serosas envolvidas, resultando em casos de pleurite, peritonite, pericardite, meningite, artrite e pneumonia (OLIVEIRA; PIJOAN, 2004). Alterações hematológicas como leucopenia severa, diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, trombocitopenia, prolongação no tempo de protrombina, a presença de microtrombos nos rins, fígado e pulmões com possíveis quadros de coagulação intravascular disseminada e choque endotóxico são alterações descritas por Amano et al. (1997) em casos de infecções experimentais de suínos SPF por estirpes de *H. parasuis*.

2.5 Tratamento e Resistência

Segundo Sobestiansky et al. (1999) o tratamento pode ser realizado com uso de vários antimicrobianos, de forma parenteral ou de forma preventiva em via ração ou água, as drogas a serem utilizadas são: penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, cloranfenicol e sulfatrimetropin e o tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível após a identificação dos sintomas, contudo a droga deve ser aumentada para atingir altos níveis nas articulações e fluidos cérebro-espinal.

Vários trabalhos já descreveram a resistência do *H. parasuis* frente a diversas drogas, em relação à penicilina como droga de escolha para tratamento da Doença de Glässer, a presença do plasmídeo pB1000 carreando o gene *blaROB-1* tem ocasionado resistência de estirpes *H. parasuis* aos β -Lactâmicos, havendo necessidade do uso de outras drogas para o tratamento (MILLAN et al., 2007). De acordo com Zhou et al. (2010) as cefalosporinas e a penicilina estão entre os antibióticos mais indicados para o tratamento da Doença de Glässer na China, mas a enrofloxacin e a trimetropim-sulfametoxazol possuem baixa eficiência. Também na China, Guo et al. (2011) relatam a resistência a fluoroquinolona associada a presença de plasmídeos.

A resistência a desinfetantes também já foi observada, Ferri et al. (2010) após testar *in vitro* a eficiência de 16 agentes químicos e 10 fórmulas comerciais de desinfetantes constatou que apenas o agente cloramina-T e 3 fórmulas comerciais foram capazes de inativar o *H. parasuis*, o que demonstra a dificuldade da adoção de medidas de controle ambiental para este microorganismo e dificulta sua eliminação das granjas.

2.6 Métodos de identificação e tipificação

Kielstein e Rapp-Grabrielson (1992) desenvolveram uma técnica de sorotipificação de difusão em gel denominada KRG que utiliza extratos termoestáveis de antígenos, na qual foram identificados quinze sorotipos de *H. parasuis* (1 ao 15), contudo uma parcela das estirpes estudadas geralmente não é tipificável sugerindo a existência de outros sorotipos. A hemaglutinação indireta, denominada de IHA, é outra metodologia utilizada para sorotipificação do *H. parasuis* que de acordo com os autores Angen et al. (2004); Tadjine et al. (2004) e Cai et al. (2005) reduz o número de amostras não tipificadas e mantém boa correlação com o método KRG.

No Brasil, utilizando-se do método KRG, Castilla et al. (2011) identificaram que os sorotipos 4 (23,6%), 14 (13,7%) e 5 (11,8%) foram os mais frequentes, sendo seguidos dos sorotipos 13 (7,8%) e 2 (1,9%), contudo mais de 41% destas amostras foram caracterizadas como não sorotipificáveis. Já na Alemanha, de um total de 290 isolados de *H. parasuis* 23,8% foram classificados como sorotipo 5, 17,2% pertenceram ao sorotipo 4 e 26,2%, número inferior ao encontrado no Brasil, dos isolados não foram sorotipificáveis (KIELSTEIN; RAPP-GRABRIELSON, 1992).

Histologicamente, a técnica da imunohistoquímica foi utilizada de forma profícua para a detecção do *H. parasuis*, segundos os autores a técnica foi boa para estudos de patogenicidade e diagnóstico retrospectivo, contudo demonstrou certo grau de inespecificidade, uma vez que há necessidade de diferenciação dos casos de infecção concomitante com um agente bacteriano importante em casos de pleuropneumonia suína por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (SEGALÉS et al., 1997).

Recentemente, Howell et al. (2015) descreveram primers para utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR) capaz de diferenciar 14 dos 15 sorotipos de *H. parasuis* até hoje descritos, contudo os sorotipos 5 e 12 não puderam ser diferenciados, ainda segundo os

autores, novos estudos sobre as diferenças da capsula desses sorotipos devam ser realizados, a fim de identificar uma forma molecular de diferenciação ou reconhecê-los como idênticos, uma vez que não possível diferenciá-los através dos genes capsulares. Outro ponto relevante deste estudo foi a capacidade de identificação das estirpes não sorotipáveis pelo método KRG e IHA. Pela PCR descrita, todas as estirpes foram identificadas, enquanto nos dois testes sorológicos, cerca de 40% das estirpes permanecem não sorotipáveis.

Devido às dificuldades de caracterização bioquímica dos isolados e a dificuldade de isolamento a partir de alguns sítios, Oliveira et al. (2001) desenvolveram uma reação em cadeia da polimerase baseada em *primers* para amplificação de genes que codificam a região 16S do RNA ribossomal do *H. parasuis*, contudo nesta reação existe a possibilidade de reação cruzada com *Actinobacillus indolicus*. Este problema foi resolvido pelo protocolo desenvolvido por Angen et al. (2007) que tornou o teste ainda mais específico.

A variabilidade dos resultados obtidos através da sorotipagem e as dúvidas sobre a existência de fatores de virulência relacionados ao agente levaram ao desenvolvimento de diferentes métodos de genotipagem. A caracterização molecular possui uma variedade de metodologias com especificidade, reprodutibilidade e poder discriminatório variável (HUNTER, 1990). Algumas destas técnicas empregadas para *H. parasuis* estão citadas a seguir

Utilizando a técnica de REP (Restriction Endonuclease Pattern), Smart, Hurnik e MacIness (1993) conseguiram diferenciar isolados de *H. parasuis* originados da cavidade nasal de isolados envolvidos no quadro sistêmico. Eles verificaram que esta técnica possui a vantagem de classificar todos os isolados, incluindo os não sorotipificáveis, Ruiz et al. (2001) utilizaram as proteínas da membrana externa para determinar o perfil genético de isolados não sorotipificáveis pelo método KRG. Rafiee et al. (2000); Macedo et al. (2011) e Moreno et al. (2011) utilizaram a ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR) e a identificaram com uma boa técnica para distinguir entre isolados de uma mesma região ou país, a ERIC-PCR detecta diferentes genótipos entre isolados do mesmo sorotipo, mas segundo Olvera, Calsamiglia e Aragon (2006) devido à baixa repetibilidade, a técnica não pode ser comparada entre diferentes laboratórios, sendo desta maneira impraticável para um estudo global. Segundo Oliveira e Pijoan (2004) esta técnica tem sua maior utilização na avaliação de estirpes para vacinas autógenas.

De la Puente Redondo et al. (2003) encontraram doze perfis diferentes para os quinze sorotipos conhecidos e 33 perfis diferentes para 101 isolados analisados de *H. parasuis*. Os

autores utilizaram a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilizando o gene *tbpA*, o qual codifica uma proteína da membrana externa. Esta técnica foi rápida e efetiva para tipificar o agente, tendo a vantagem de não necessitar de culturas puras, podendo ser utilizada diretamente em amostras biológicas como secreções nasais e tecidos pulmonares ou culturas com crescimento de agentes contaminantes. Chu et al. (2011) baseando-se no gene *ompA* também realizaram a técnica do RFLP em amostras de *H. parasuis* isoladas no noroeste da China. Segundo os autores, este método pode ser utilizado em estudos de epidemiologia e considerado alternativo para a sorotipagem.

Blackall et al. (2004) analisaram estirpes de *H. parasuis* através técnica de MEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) e demonstraram haver uma considerável diversidade genética entre os isolados pertencentes ao mesmo sorotipo, sugerindo que o método de sorotipagem não é o mais apropriado para tipificar estirpes em estudos epidemiológicos.

Millan et al. (2007) descreveram pela primeira vez na literatura o uso da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado com a enzima *SmaI* para *H. parasuis*, concluindo ser esta uma boa técnica para a caracterização do agente e correlacionando os perfis observados com resistência a antimicrobianos beta lactâmicos mediada por plasmídeos. Castilla et al. (2011) descrevem a caracterização do agente através da PFGE com a enzima *Not I* e através do polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP), no entanto neste estudo foi observada uma grande variabilidade das estirpes sem grande correlação com os dados epidemiológicos.

A partir de estudos de 2004 de Chrintensen et al. (2004) que compararam genes *housekeepings* de membros da família *Pasteurellaceae* e em continuidade a partir de 2006, utilizando o sistema de tipagem baseado em sequenciamento de múltiplos sítios (Multilocus sequence typing - MLST), Olvera, Cerdà-Cuellar e Aragon observaram que estirpes supostamente não virulentas isoladas da cavidade nasal foram estatisticamente associadas a um grupo diferente das estirpes isoladas de lesões clínicas. Mullins et al. (2013) dando continuidade aos trabalhos de Olvera et al. (2006) fizeram melhorias nos primers utilizados para amplificação dos 7 genes *housekeeping* descritos anteriormente e tornaram as PCR mais específicas evitando-se alguns casos de dificuldade de amplificação e aumento da especificidade dos mesmos.

A técnica de MLST tem sido considerada por vários autores como uma ótima técnica para identificar perfis genotípico de amostras, facilitando o estudo das características epidemiológicas de diversas populações de micro-organismos dentre populações próximas ou mesmo de vários países, uma vez que a técnica baseada em sequenciamento e comparação de

sequencias moleculares que podem estar disponíveis em bancos de dados genômicos na rede mundial de computadores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente os isolados de *H. parasuis* isolados de suínos da região Centro-Sul do Brasil.

3.1 Objetivos Específicos

- 1) Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes de *H. parasuis* pela determinação da concentração inibitória mínima;
- 2) Identificar as estirpes de *H. parasuis* quanto ao sorotipo;
- 3) Caracterizar as estirpes de *H. parasuis* quanto a presença do gene de virulência *vtaA*;
- 4) Caracterizar as estirpes de *H. parasuis* pela técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE);
- 5) Caracterizar as estirpes de *H. parasuis* pela técnica de sequenciamento de múltiplos sítios (MLST);
- 6) Confrontar os perfis genotípicos obtidos na PFGE com os obtidos no MLST.

4 MATERIAL E METODO

4.1 Amostras

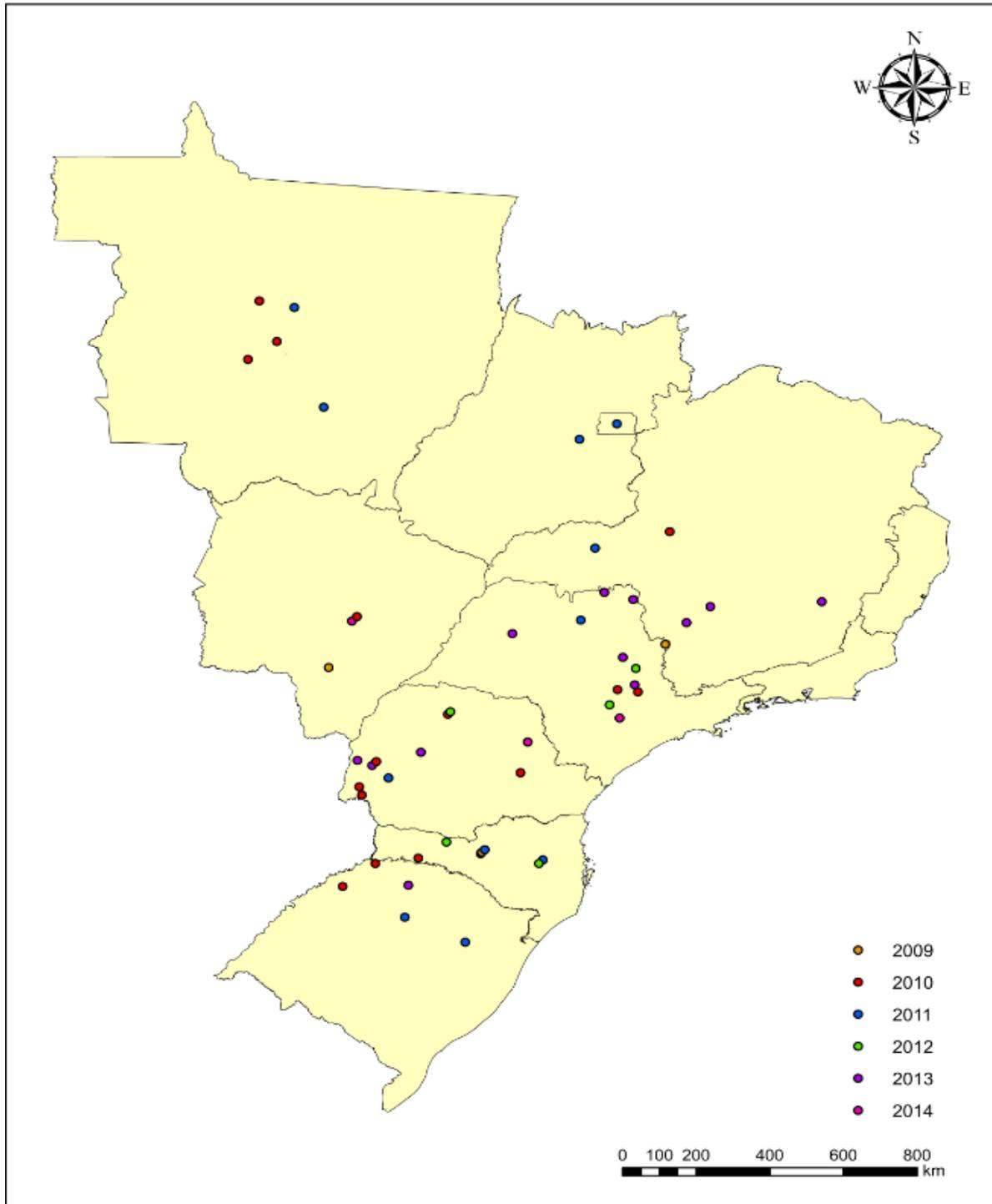
Foram utilizadas 117 estirpes isoladas de 83 animais provenientes de 53 granjas de suínos de diferentes estados do Brasil entre os anos de 2009 a 2014 (Figura 1).

Todas as amostras foram isoladas de suínos com sinais clínicos de poliserosite, pneumonia e/ou meningite de nove estados do Brasil, essas estirpes pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia – VPS – FMVZ – USP (Tabela 1). As estirpes foram reativadas em caldo BHI com 5% de soro fetal bovino e NAD e semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) com estria de *S. aureus* para verificar a morfologia e a presença do fenômeno de satelitismo.

4.2 Sorotipagem

A sorotipagem das estirpes foi realizada no Instituto *Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna* - Sezione di Reggio Emilia, pelo Dr. Andrea Luppi. As estirpes foram cultivadas em caldo BHI, suplementado com NAD (0,01%) e soro fetal bovino (5%) por 24h a 48h a 37°C em condições de microaerofilia. A sorotipagem foi realizada através do teste de imunodifusão usando antígenos autoclavados (KIELSTEIN; RAPP-GABRIELSON, 1992).

Figura 1 - Distribuição das granjas em que foram isoladas as estirpes de *H. parasuis* ao longo dos anos de 2009 a 2014



Fonte: (SILVA, G. F. R.; 2016).

Tabela 1- Distribuição dos Isolados de *H. parasuis* do banco de amostras do Laboratório de Sanidade Suína-VPS-FMVZ/USP

(Continua)

Granja	Cidade/Estado	Nº de animais	Nº de Estirpes	Fonte de Isolamento		
				Pulmão	Líquido Pericárdico	Cérebro
G1	Caconde/SP	2	4	4	0	0
G2	Dourados/MS	1	1	1	0	0
G3	Videira/SC	1	2	2	0	0
G4	Nova Odessa/SP	1	2	2	0	0
G5	Carambeí/PR	1	2	0	2	0
G6	Vista Gaúcha/RS	1	1	1	0	0
G7	Tapurá/MT	1	2	2	0	0
G8	Nova Mutum/MT	1	2	2	0	0
G9	Patos de Minas/MG	1	2	2	0	0
G10	Piracicaba/SP	1	2	2	0	0
G11	Medianeira/PR	4	8	6	2	0
G12	Toledo/PR	1	2	2	0	0
G13	Serranópolis/PR	1	3	3	0	0
G14	Santa Rosa/RS	1	2	2	0	0
G15	Campo Grande/MS	1	2	2	0	0
G16	Maringá/PR	1	2	2	0	0
G17	Diamantino/MT	1	2	2	0	0
G18	Chapecó/SC	1	2	2	0	0
G19	Cascavel/PR	1	2	2	0	0
G20	Abadiânia/GO	1	2	2	0	0
G21	Videira/SC	1	2	2	0	0
G22	Videira/SC	3	5	3	2	0
G23	Uberlândia/MG	2	4	4	0	0
G24	Rio do Sul/SC	6	12	10	2	0
G25	Monte Azul Paulista/SP	1	1	1	0	0
G26	Brasília/DF	2	2	2	0	0
G27	Sorriso/MT	1	1	1	0	0
G28	Carlos Borba/RS	2	2	2	0	0
G29	Selbach/RS	2	2	2	0	0
G30	Campo Verde/MT	1	1	0	0	1
G31	Maringá/PR	2	2	2	0	0

(Conclusão)						
Granja	Cidade/Estado	Nº de animais	Nº de Estirpes	Fonte de Isolamento		
				Líquido		
				Pulmão	Pericárdico	Cérebro
G32	Leme/SP	2	2	2	0	0
G33	Rio do Sul/SC	4	4	4	0	0
G34	Passos Maia/SC	3	3	3	0	0
G35	Pereiras/SP	3	3	3	0	0
G36	Miguelópolis/SP	1	1	1	0	0
G37	Desacalvado/SP	1	1	1	0	0
G38	Mamborê/PR	1	1	1	0	0
G39	Marechal Cândido Rondon/PR	1	1	1	0	0
G40	Carmo do Rio Claro/MG	2	2	2	0	0
G41	Rondinha/RS	1	1	1	0	0
G42	Birigui/SP	1	1	1	0	0
G43	Toledo/PR	2	2	2	0	0
G44	Oratórios/MG	2	2	2	0	0
G45	Formiga/MG	1	1	1	0	0
G46	Limeira/SP	2	2	2	0	0
G47	Cristais Paulista/SP	1	1	1	0	0
G48	Formiga/MG	2	2	2	0	0
G49	Marechal Cândido Rondon/PR	1	1	1	0	0
G50	Marechal Cândido Rondon/PR	2	2	2	0	0
G51	Arapori/PR	1	1	1	0	0
G52	Capela do Alto/SP	1	1	1	0	0
G53	Campo Grande/MS	1	1	1	0	0
Total		83	117	109	8	1

4.3 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana das 117 estirpes foram avaliados por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo teste de microdiluição em caldo conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008). A CIM foi determinada utilizando-se o teste Sensititre - Custom Plate Format BOPO6F (TREK Diagnostic Systems- Thermo Fisher). Os antimicrobianos testados foram ampicilina, clindamicina, clortetraciclina, danofloxacin, enrofloxacin, florfenicol, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, penicilina, sulfadimetoxina, espectinomicina, cotrimoxazole (trimetoprima/ sulfametoxazole), tiamulina, tilmicosina, tulatromicina, tilosina, ceftiofur (quadro 1). O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado a partir de um cultivo puro de *H. parasuis* em caldo cérebro-coração (BHI) suplementado com soro fetal bovino e NAD, de 24 a 48 horas.

A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada continha aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. A partir desta diluição um volume de 100 μL de cada estirpe foi diluído em 11 mL de caldo Mueller-Hinton II suplementado com soro fetal bovino e NAD. Em cada poço da placa foi distribuído 50 μL da suspensão de células bacterianas e a placa foi incubada a 37° C por 24 a 48h para leitura dos resultados.

No teste de microdiluição foi utilizada como controle a estirpe padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, como preconizado pelo manual do CLSI (CLSI, 2008).

Quadro 1 - Critérios utilizados para avaliação dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Antimicrobiano	Classificação			Sigla
	Sensível	Intermediário	Resistente	
Ampicillina	≤ 0.25	0.5 - 4	≥ 8	AMP
Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8	TIO
Clindamicina	≤ 0.5	1-2	≥ 5	CLI
Clortetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	CTET
Cotrimoxazole*	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	SXT
Danofloxacina	≤ 0.25	-	-	DAN
Enrofloxacin	≤ 0.25	0.5 - 1	≥ 2	ENO
Florfenicol	≤ 4	8	≥ 16	FFN
Gentamicina	≤ 2	4	≥ 8	GEN
Neomicina	≤ 8	-	-	NEO
Oxitetraciclina	≤ 4	8	≥ 16	OXY
Penicillina	≤ 0.12	-	-	PEN
Espectinomicina	≤ 32	64	≥ 128	SPE
Sulfadimetoxina	≤ 256	-	≥ 512	SDM
Tiamulina	≤ 16	-	≥ 32	TIA
Tilmicosina	≤ 16	-	≥ 32	TIL
Tulathromicina	≤ 16	32	≥ 64	TUL
Tilosina	≤ 1	2-4	> 4	TYLT

*trimetoprima/ sulfametoxazole

4.4 Extração de DNA

As amostras previamente identificadas como *H. parasuis* foram submetidas à extração do DNA genômico segundo descrito por Boom et al. (1990) e foram estocadas a -20°C .

4.5 Reação em cadeia pela polimerase

A PCR para confirmação do gênero/espécie foi realizada conforme descrito por Oliveira et al. (2001) e para detecção dos genes de virulência *vtaA* (*virulence-associate dtrimeric aut transporters*) foi utilizado o protocolo descrito por Olvera et al. (2010) ambos descritos no quadro 1. Para a detecção dos genes de virulência a reação foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* (quadro 2), 1.0 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Inc, Maryland/USA.), 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. Os parâmetros das reações foram ajustados segundo o descrito pelos diferentes autores.

A detecção dos produtos de amplificação (10 µl produto e 2µl de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados em sistema de fotodocumentação Gel Doc XR system (Bio-Rad Laboratories, California, USA), sendo os mesmos corados com BlueGreen. ® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

Quadro 2 - Sequência dos oligonucleotídeos que foram empregados na identificação do agente e na detecção dos genes de virulência *vtaA*

Gene alvo	<i>Primer</i>	Sequência
16SrRNA	HPS-foward	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT
	HPS-reverse	GGCTTCGTCACCCTCTGT
<i>vtaA</i> domínio 1	YADAF1	TTTAGGTAAAGATAAGCAAGGAAATCC
	PADHR1	CCACACAAAACCTACCCCTCCTCC
<i>vtaA</i> domínio 3	YADAF3	AATGGTAGCCAGTTGTATAATGTTGC
	PADHR3	CCACTGTAATGCAATACCTGCACC

4.6 Eletroforese em campo pulsado - PFGE

Para o preparo dos blocos foram utilizados 10 ml de culturas de *H. parasuis* em meio líquido. A cultura foi centrifugada por 20 minutos a 16.000X g numa temperatura entre 4 e 8°C e o sedimento foi ressuspense em solução salina estéril a fim de medir sua densidade óptica (DO), em espectrofotômetro (650nm), sendo definida a DO de *H. parasuis* entre 0,25 e 0,35 nm, como a ideal para a realização do PFGE. A suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 16.000X g e o sedimento foi ressuspense em tampão PIV (Tris HCl 0,01M; NaCl 1M) adicionado de um igual volume de agarose de baixo ponto de fusão a 1,5% para preparação dos moldes (Bio-RadLaboratories, California, USA). Os blocos foram incubados durante a noite a 37° C no tampão de lise II (1M NaCl, 10 mM Tris, [pH 8.0], 200 mM EDTA, [pH 8.0], 0,5% N-laurilsarcosina, 0,2% ácido dexoxicolico), com 20 µl (50 mg/ml) de lisozima. Seis horas após a o início da incubação foi adicionada 19,5 µl de proteinase K (20 mg/ml). Após este período o tampão de lise foi removido e os blocos foram lavados duas vezes com água bidestilada e duas vezes com tampão TE (5mM Tris, [pH 8.0], 1mM EDTA, [pH 8.0]). Os blocos foram então estocados em tampão TE (5mM Tris, [pH 8.0], 1mM EDTA, [pH 8.0]) e mantidos a 4° C.

Os blocos de dez estirpes foram submetidos a macro-restrição com as enzimas propostas – *NotI*, *ApaI*, *AscII*, *XbaI*, *SpeI* e *RsrII*. O DNA digerido foi separado em agarose Seaken (Lonza) utilizando o sistema CHEF DR III (Bio-RadLaboratories, California, USA). A corrida foi realizada em 22 horas com tempos de pulso inicial de 5,5 segundos e final de 63,5 segundos, voltagem de 6Vcm Os géis foram corados por 40min em uma solução de Syber Safe® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA/USA) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de fotodocumentação. Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de alto peso molecular Lambda PFG Marker (New EnglandBioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.7Análise estatística da PFGE

Para análise estatística dos fragmentos gerados será utilizado o programa Bionumerics (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras será estimada por

meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada será possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA).

4.8 Amplificação dos genes empregados no MLST

Após o término da eletroforese em campo pulsado com a enzima *RsrII*, uma estirpe de cada pulstipo será avaliada através do MLST.

A PCR para detecção dos genes descritos no quadro 3 será realizada em duplicata utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer*, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas Inc, Maryland/USA.), 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. Os parâmetros das reações serão ajustados segundo o descrito pelos diferentes autores.

Quadro 3 - Sequência dos oligonucleotídeos que serão empregados na amplificação dos genes empregados no MLST

<i>Gene Alvo</i>	<i>Primer</i>	Sequência	Referência
<i>atpD</i>	atpDF	CAAGATGCAGTACCAAAAGTTTA	Mullins et al. (2013)
	atpDR	ACGACCTTCATCACGGAAT	
<i>infB</i>	infBF	CCTGACTAYATTCGTAAAGC	Mullins et al. (2013)
	infBR	ACGACCTTTATCGAGGTAAG	
<i>mdh</i>	mdh-up	TCATTGTATGATATTGCCCC	Mullins et al. (2013)
	hdh-dn	ACTTCTGTACCTGCATTTTG	
<i>rpoB</i>	rpoBF	TCACAACCTTTCICAATTTATG	Mullins et al. (2013)
	rpoBR	ACAGAAACCACTTGTGCG	
<i>6pgd</i>	6pgdF	ACAGAAACCACTTGTGCG	Mullins et al. (2013)
	6pgdR	CGTTGATCTTTGAATGAAGA	
<i>g3pd</i>	3gpdF	GGTCAAGACATCGTTTCTAAC	Mullins et al. (2013)
	3gpdR	TCTAATACTTTGTTTGAGTAACC	
<i>frdB</i>	frdBf	CATATCGTTGGTCTTGCCGT	Mullins et al. (2013)
	frdBR	TTGGCACTTTCGATCTTACCTT	

A detecção dos produtos de amplificação (50 µl produto e 5µl de tampão de corrida 6X) será realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA) e os fragmentos amplificados serão visualizadas em sistema de fotodocumentação, sendo os mesmos corados com BlueGreen. ® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

4.9 Sequenciamento

Os produtos do PCR serão purificados usando o kit Miniprep para Extração de DNA em Gel (Axygen), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados serão sequenciados nos sentidos senso e antisenso usando os mesmos primers da PCR. Será utilizado o kit para sequenciamento Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os produtos amplificados serão purificados em Sephadex-G50 (Farmacia) e sequenciados no aparelho ABI 3730/3730x1 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

4.10 Análise dos dados do MLST

As sequências dos genes individuais ou concatenadas serão alinhadas usando o programa BioEdit versão 7.09.0 (HALL, 1999) ou Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

4.11 Análise Filogenética

A análise filogenética será realizada utilizando-se os softwares Mega 4.1 e BioNumerics 6.6 e o modelo de distância de Tamura-3 para a construção de uma árvore de Neighbor-Joining e o cálculo de bootstrap em 1000 replicatas.

5 RESULTADOS

Todas as estirpes foram confirmadas como *H. parasuis* através da PCR e foram positivas para os genes de virulência *vtaA* (*virulence-associated trimeric autotransporters*). A Tabela 2 apresenta as características das estirpes em relação aos sorotipos identificados.

Tabela 2 - Distribuição dos Isolados de *H. parasuis* do banco de amostras do Laboratório de Sanidade Suína-VPS-FMVZ/USP e sorotipos identificados

Granja	Cidade/Estado	Nº de animais	Nº de Estirpes	Sorotipos	(Continua)		
					Fonte de Isolamento		
					Líquido		
				Pulmão	Pericárdico	Cérebro	
G1	Caconde/SP	2	4	13 (4)	4	0	0
G2	Dourados/MS	1	1	NT	1	0	0
G3	Videira/SC	1	2	NT	2	0	0
G4	Nova Odessa/SP	1	2	NT	2	0	0
G5	Carambeí/PR	1	2	NT	0	2	0
G6	Vista Gaúcha/RS	1	1	13	1	0	0
G7	Tapurá/MT	1	2	14 (2)	2	0	0
G8	Nova Mutum/MT	1	2	NT	2	0	0
G9	Patos de Minas/MG	1	2	NT	2	0	0
G10	Piracicaba/SP	1	2	4 (2)	2	0	0
G11	Medianeira/PR	4	8	4 (4), NT	6	2	0
G12	Toledo/PR	1	2	14 (2)	2	0	0
G13	Serranópolis/PR	1	3	4 (3)	3	0	0
G14	Santa Rosa/RS	1	2	5 (2)	2	0	0
G15	Campo Grande/MS	1	2	NT	2	0	0
G16	Maringá/PR	1	2	4(1), 5(1)	2	0	0
G17	Diamantino/MT	1	2	NT	2	0	0
G18	Chapecó/SC	1	2	4(1),14(1)	2	0	0
G19	Cascavel/PR	1	2	NT	2	0	0
G20	Abadiânia/GO	1	2	4(1), 5(1)	2	0	0
G21	Videira/SC	1	2	4(1), 5(1)	2	0	0
G22	Videira/SC	3	5	4(1),14(1),NT	3	2	0

(Continua)

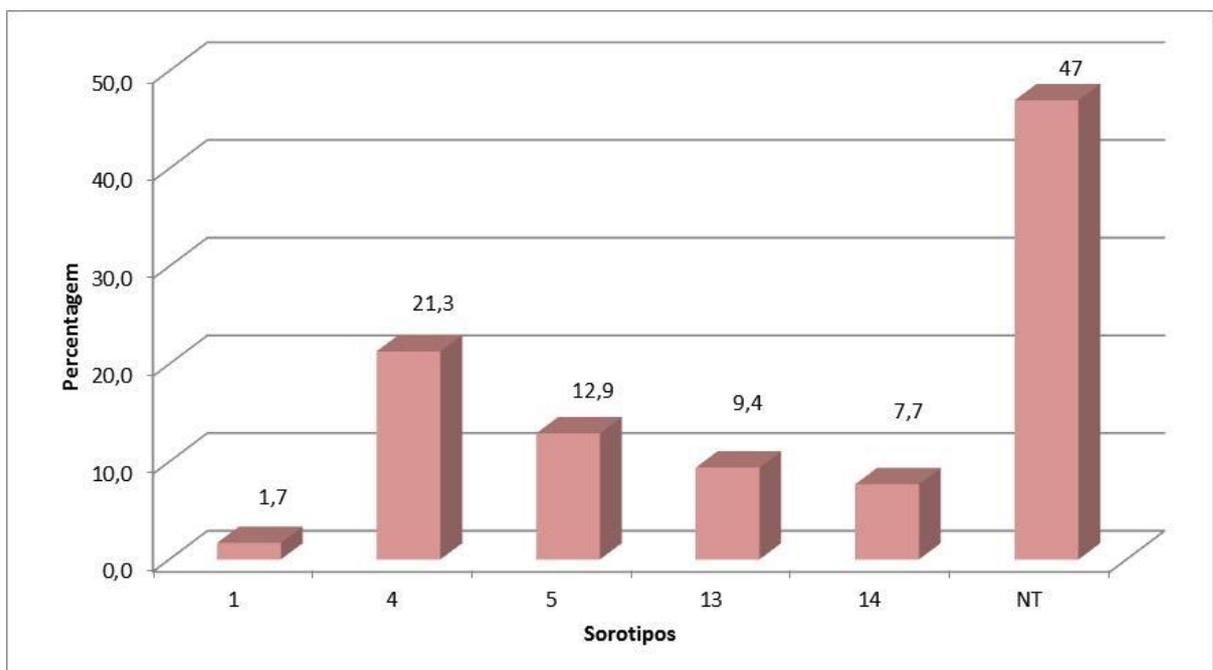
Granja	Cidade/Estado	Nº de animais	Nº de Estirpes	Sorotipos	Fonte de Isolamento		
					Pulmão	Pericárdico	Cérebro
G23	Uberlândia/MG	2	4	4(2),5(1), NT	4	0	0
G24	Rio do Sul/SC	6	12	5(4),13 (2),14(1),NT	10	2	0
G25	Monte Azul Paulista/SP	1	1	13	1	0	0
G26	Brasília/DF	2	2	4(2)	2	0	0
G27	Sorriso/MT	1	1	5	1	0	0
G28	Carlos Borba/RS	2	2	NT	2	0	0
G29	Selbach/RS	2	2	14(2)	2	0	0
G30	Campo Verde/MT	1	1	NT	0	0	1
G31	Maringá/PR	2	2	1(2)	2	0	0
G32	Leme/SP	2	2	NT	2	0	0
G33	Rio do Sul/SC	4	4	NT	4	0	0
G34	Passos Maia/SC	3	3	13(1), NT	3	0	0
G35	Pereiras/SP	3	3	4(2), NT	3	0	0
G36	Miguelópolis/SP	1	1	13	1	0	0
G37	Desacalvado/SP	1	1	4	1	0	0
G38	Mamborê/PR	1	1	NT	1	0	0
G39	Marechal Cândido Rondon/PR	1	1	4	1	0	0
G40	Carmo do Rio Claro/MG	2	2	13, NT	2	0	0
G41	Rondinha/RS	1	1	NT	1	0	0
G42	Birigui/SP	1	1	NT	1	0	0
G43	Toledo/PR	2	2	5(2)	2	0	0
G44	Oratórios/MG	2	2	NT	2	0	0
G45	Formiga/MG	1	1	NT	1	0	0
G46	Limeira/SP	2	2	NT	2	0	0
G47	Cristais Paulista/SP	1	1	NT	1	0	0
G48	Formiga/MG	2	2	NT	2	0	0
G49	Marechal Cândido Rondon/PR	1	1	NT	1	0	0
G50	Marechal Cândido Rondon/PR	2	2	5(2)	2	0	0

Granja	Cidade/Estado	Nº de animais	Nº de Estirpes	Sorotipos	(Conclusão)		
					Fonte de Isolamento		
					Líquido		
		Pulmão	Pericárdico	Cérebro			
G49	Marechal Cândido Rondon/PR	1	1	NT	1	0	0
G50	Marechal Cândido Rondon/PR	2	2	5(2)	2	0	0
G51	Arapori/PR	1	1	4	1	0	0
G52	Capela do Alto/SP	1	1	4	1	0	0
G53	Campo Grande/MS	1	1	4	1	0	0
Total		83	117		109	8	1

*Os valores entre parênteses referem-se ao número de estirpes identificadas por sorotipo.

A sorotipagem das estirpes revelou uma alta frequência de estirpes não tipáveis através do teste de imunodifusão, representando um total de 47% das estirpes, Gráfico 1. O sorotipo mais frequente foi o 4 (21,3%), seguido do 5 (12,9%), do 13 (9,4%), do 14 (7,7%) e do sorotipo 1 (1,7%).

Gráfico 1 - Frequência de sorotipos identificados nas 117 estirpes de *H. parasuis* avaliadas



Os resultados obtidos a partir da determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos contra as 117 estirpes testadas são ilustrados na tabela 6. Observa-se que os antimicrobianos que apresentaram índices de resistência foram gentamicina (0%), seguida por tiamulina (1,7%), ceftiofur (2,56%) e florfenicol (2,56%), espectimomicina (5,12%), tulatromicina (6,83%), neomicina (16,23%), tilmicosina (17,02%), ampicilina (20,51%), clortetraciclina (25,4%) e oxitetraciclina (38,47%). Os que apresentaram o maior índice de resistência foram tilosina (98,29%), danofloxacina (95,72%), sulfadimetoxina (88,03%), penicilina (77,7%), cotrimoxazol (60,68%), clindamicina (50,42%) e enrofloxacina (45,29%). Na tabela 3 podem ser observadas as distribuições das concentrações inibitórias mínimas de cada antibiótico testado, além dos valores de CIM₅₀(µg/mL) e CIM₉₀(µg/mL).

Tabela 3 - Frequência de estirpes resistentes aos antimicrobianos testados de acordo com as diferentes classes avaliadas

			(Continua)
Classe	Antimicrobiano	N	(%)
Beta lactâmicos	Ampicilina	24	20,51
	Ceftiofur	3	2,56
	Penicilina	88	77,7
Tetraciclina	Oxitetraciclina	45	38,47
	Clortetraciclina	31	25,64
Fluorquinolonas	Danofloxacina	112	95,72
	Enrofloxacina	53	45,29
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0	0
	Neomicina	19	16,23
	Espectinomicina	6	5,12
Fenicois	Florfenicol	3	2,56
Sulfas	Sulfadimetoxina	103	88,03
	Cotrimoxazol*	71	60,68

Classe	Antimicrobiano	N	(Conclusão)
			(%)
Lincosamidas	Clindamicina	59	50,42
Pleuromutilinas	Tiamulina	1	1,7
	Tilmicosina	20	17,09
Macrolídeos	Tilosina	115	98,29
	Tulatromicina	8	6,83

*trimetoprima/ sulfametoxazole

Os perfis de resistência obtidos variaram bastante levando a discriminação das 117 estirpes avaliadas em 89 perfis diferentes. Observou-se uma estirpe sensível a todos os antibióticos testados e uma estirpe resistente a 13 das 18 drogas avaliadas (Figura 2).

Foi possível identificar 109 (93,16%) estirpes multirresistentes, ou seja, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, contra apenas 8 estirpes (6,83%) resistentes a 2 classes ou menos (Tabela 3).

Tabela 4 - Distribuição dos valores de MIC obtidos dentre as 117 estirpes avaliadas, valores de MIC50, MIC90 e frequência de estirpes resistentes

Antimicrobianos	Número de estirpes*								CIM* ₅₀ (µg/mL)	CIM* ₉₀ (µg/mL)	Res %
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	≤0,25	2	20,51
Ampicilina	78	15	12	3	0	3	3	3			
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8		≤0,25	0,5	2,56
Ceftiofur	101	5	4	4	8	0	3				
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16	2	8	50,42
Clindamicina	0	4	9	45	38	11	3	7			
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	>8			≤0,5	4	25,64
Clortetraciclina	66	21	14	11	5	0					
CIM (µg/mL)	≤2/38	>2/38							≤2/38	>2/38	60,68
Cotrimoxazol**	46	71									
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	>1				1	>1	95,72
Danofloxacina	5	18	27	8	59						
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	2	>2			1	>2	45,29
Enrofloxacina	23	25	7	9	22	31					
CIM (µg/mL)	≤8	16	32	64	>64				≤8	≤8	5,12
Espectinomicina	108	3	0	4	2						
CIM (µg/mL)	≤0,25	0,5	1	2	4	8	>8		0,5	1	2,56
Florfenicol	26	70	11	5	2	2	1				
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	>16			≤1	2	0
Gentamicina	60	52	5	0	0	0					
CIM (µg/mL)	≤4	8	16	32	>32				≤4	8	16,23
Neomicina	98	15	2	0	2						
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	>8			1	4	38,46
Oxitetraciclina	38	34	28	12	3	2					
CIM (µg/mL)	≤0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	>8	0,25	2	77,77
Penicilina	29	44	27	6	3	0	0	8			
CIM (µg/mL)	≤256	>256							>256	>256	88,03
Sulfadimetoxina	14	103									
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	16	32	>32	8	16	1,7
Tiamulina	2	1	3	27	52	31	1	0			
CIM (µg/mL)	≤4	8	16	32	64	>64			≤4	64	17,09
Tilmicosina	89	6	2	6	9	5					
CIM (µg/mL)	≤0,5	1	2	4	8	16	32	>32	16	>32	98,29
Tilosina	0	1	1	1	40	37	16	21			
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	32	64	>64	2	32	6,83
Tulatromicina	51	37	8	5	1	7	3	5			

*Células de preenchidas de cinza claro com uma barra na lateral esquerda indicam estirpes resistentes aos antimicrobianos segundo os pontos de corte utilizados.**trimetoprima/ sulfametoxazole

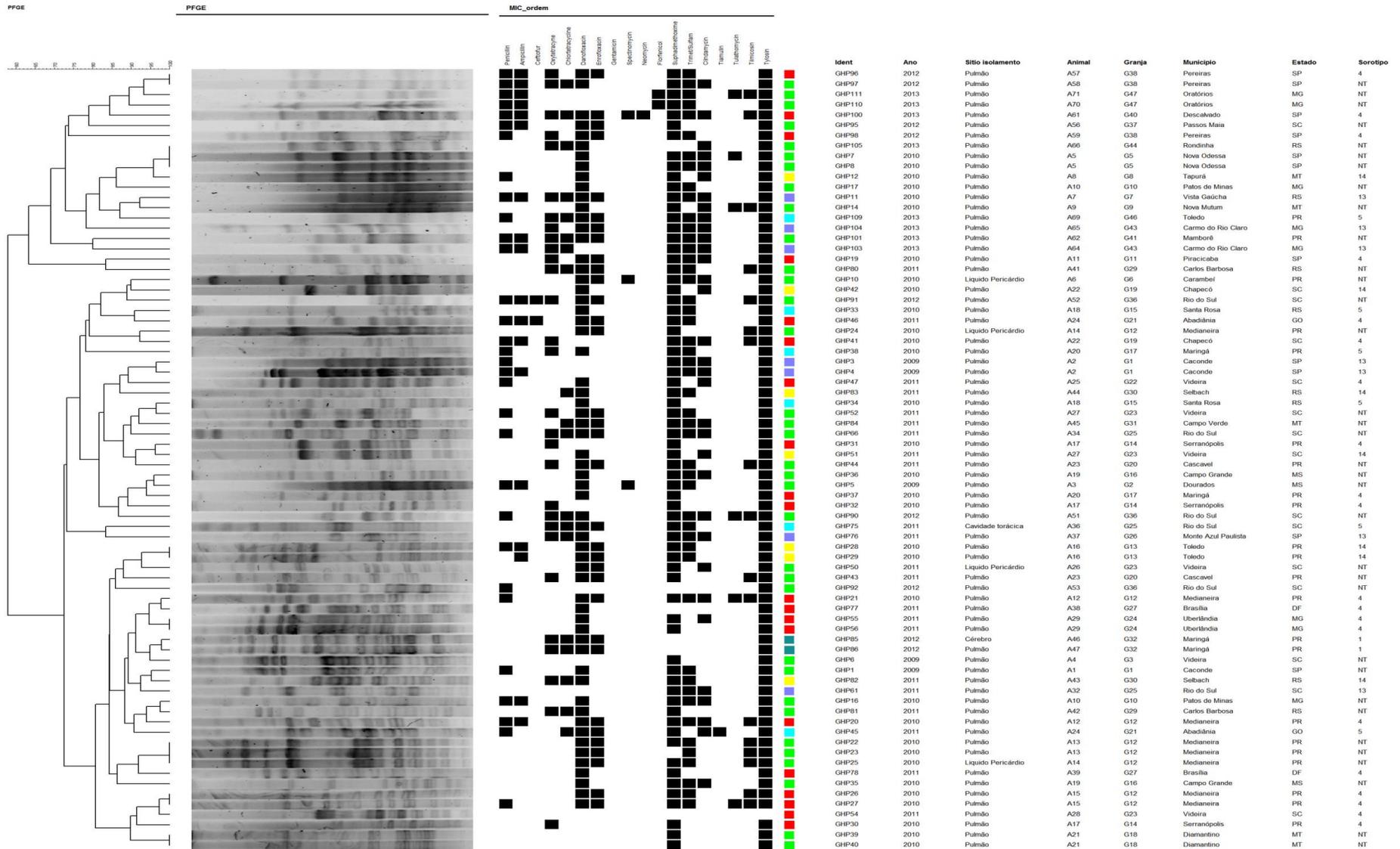
Tabela 5 - Frequência de estirpes de *H. parasuis* apresentando multirresistência aos antimicrobianos testados

Classificação		
	N	%
Resistentes a 2 classes ou menos	8	6,83
Multirresistentes (3 classes ou mais)	109	93,16

Dentre as 117 estirpes avaliadas apenas 76 apresentaram perfil na análise pela PFGE e os resultados obtidos são ilustrados na Figura 3. Neste dendrograma é possível visualizar três grandes grupamentos com similaridade inferior a 60%. O grupamento A foi formado por 20 estirpes de 17 perfis diferentes. Este grupamento se destaca por reunir todas as estirpes isoladas em 2013, algumas de 2012 e de 2010.

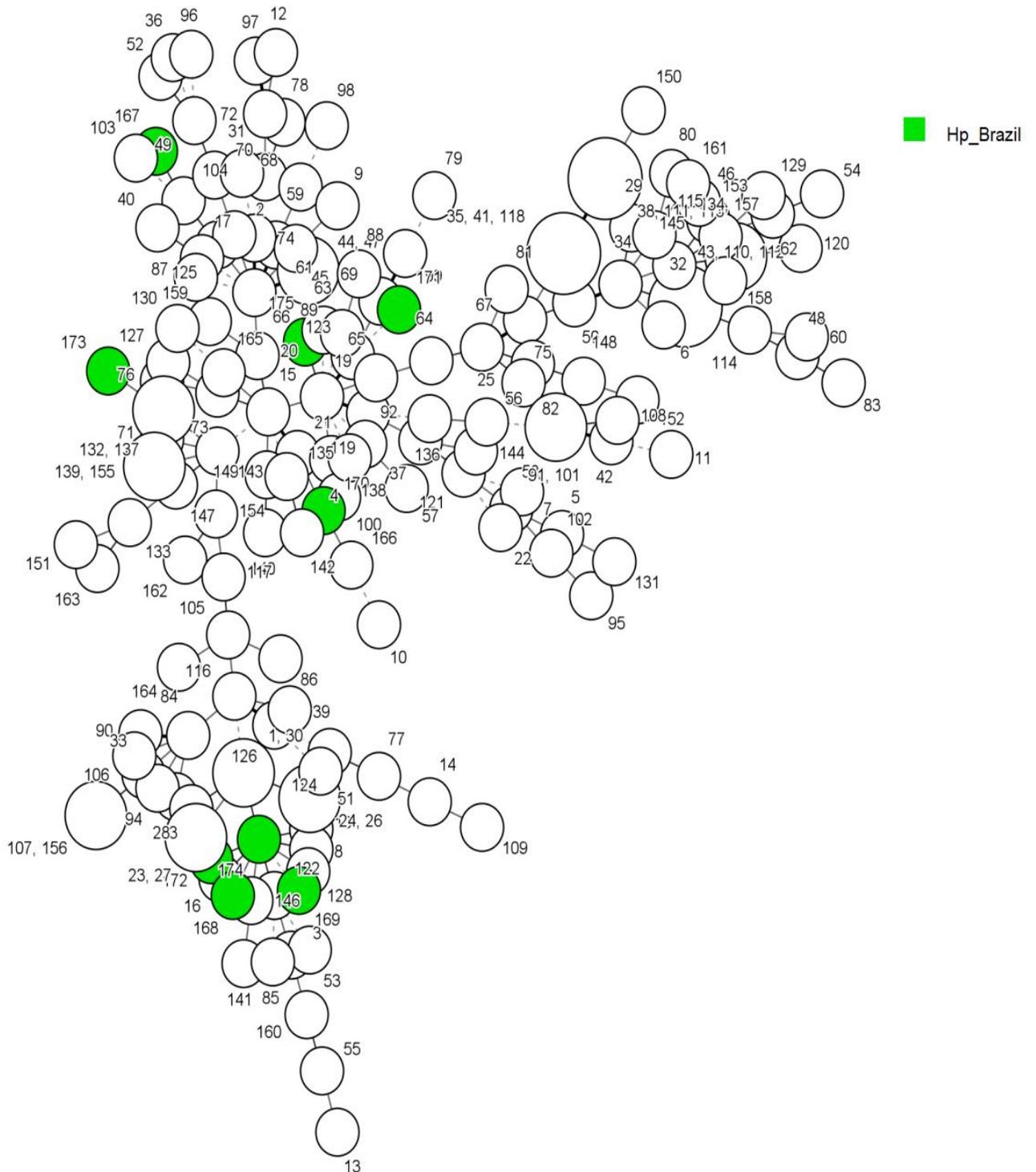
O Grupamento B reuniu 26 estirpes de 26 perfis diversos reunindo amostras dos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012. O grupamento C reuniu 30 estirpes em 24 perfis incluindo os anos de 2009, 2010, 2011 e 2012. As estirpes dos diferentes sorotipos ficaram distribuídas nos diferentes grupamentos formados de forma semelhante, assim como as estirpes resistentes aos vários antimicrobianos testados. A análise de nove estirpes através do MLST foi realizada e de acordo com os resultados nove novos STs foram identificados. Estes foram comparados às sequências depositadas no <http://pubmlst.org/hparasuis/> como pode ser observado nas Figuras 4 e 5.

Figura 3 - Dendrograma gerado a partir da análise pelo PFGE de 76 estirpes de *H. parasuis* com a enzima RsrII



Fonte: (SILVA, G. F. R.; 2016).

Figura 4 - Representação gráfica da distribuição das cepas brasileiras de *H. parasuis* em comparação com as cepas caracterizadas através do MLST em todo o mundo (As cepas nacionais são representadas em verde com a numeração de 167 a 175)



Fonte: (SILVA, G. F. R; 2016).

Figura 5 - Dendrograma apresentando a distribuição das cepas brasileiras de *H. parasuis* em comparação com as cepas caracterizadas através do MLST em todo o mundo. As cepas nacionais são representadas em vermelho e identificadas com a numeração dos STs identificados. (Continua)

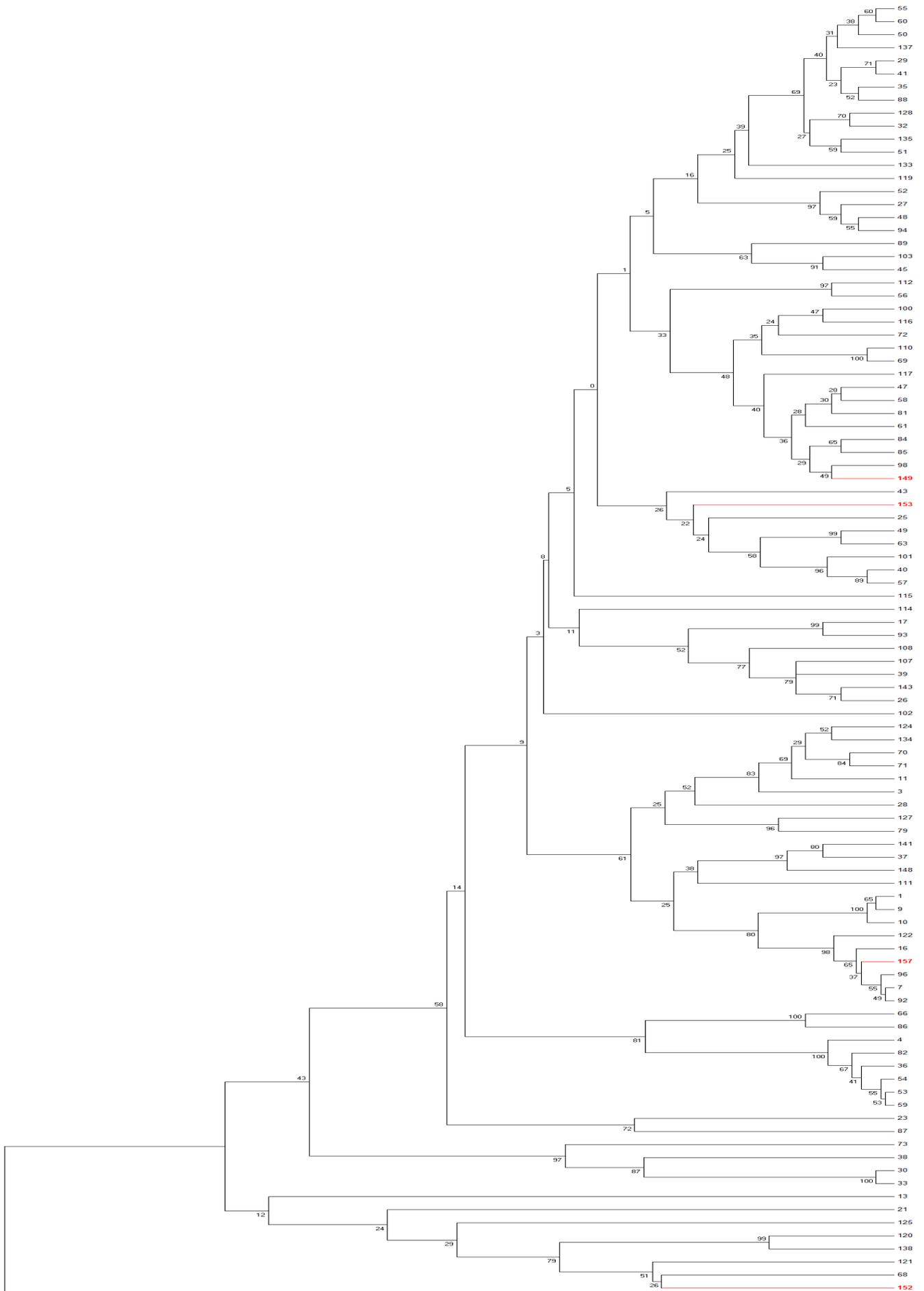
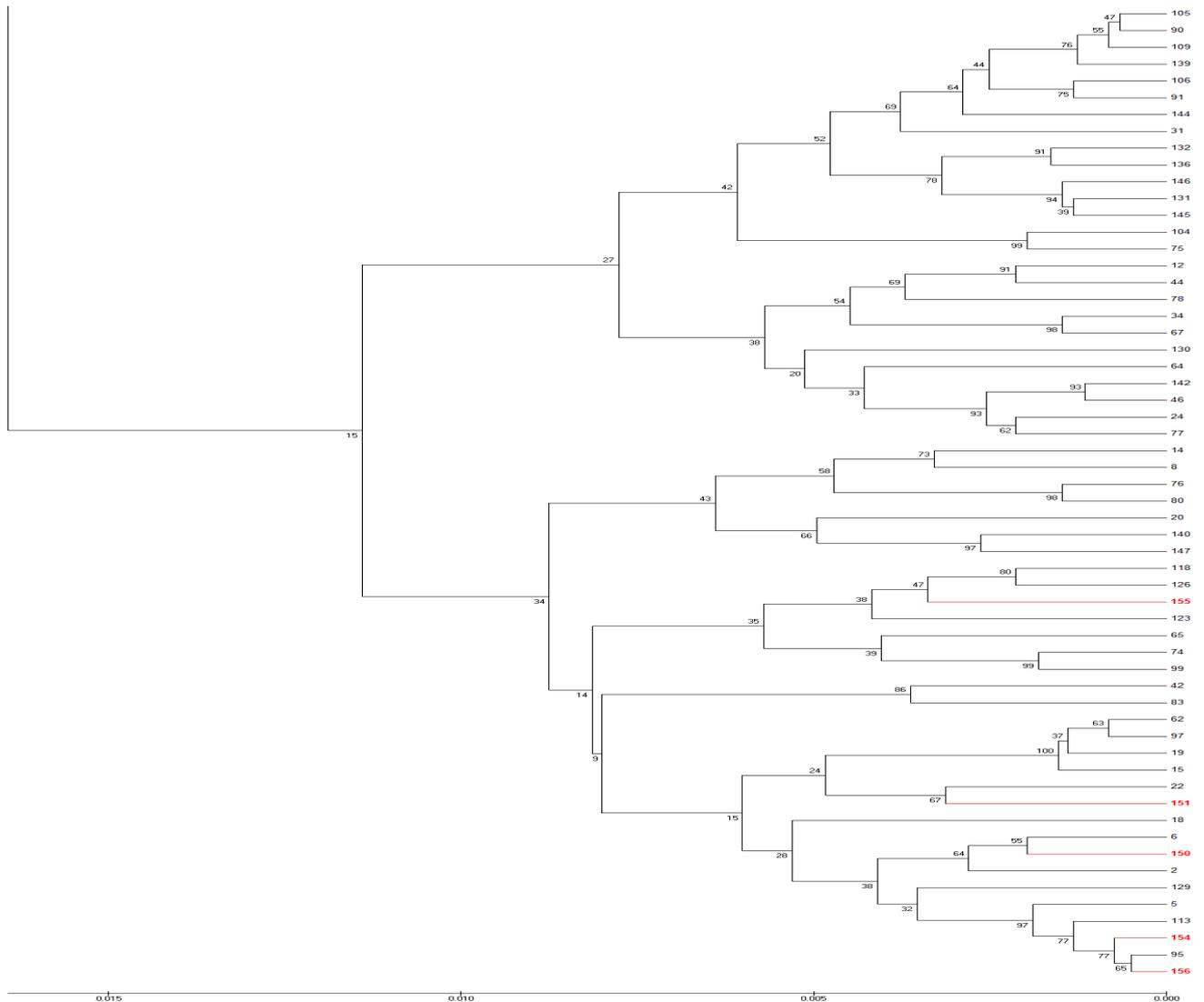


Figura 6 - Dendrograma apresentando a distribuição das cepas brasileiras de *H. parasuis* em comparação com as cepas caracterizadas através do MLST em todo o mundo. As cepas nacionais são representadas em vermelho e identificadas com a numeração dos STs identificados. (Conclusão)



A análise de nove estirpes através do MLST revelou nove novos STs que foram comparados às sequências depositadas no <http://pubmlst.org/hparasuis/> nas Figuras 4 e 5. As estirpes brasileiras foram distribuídas nas diferentes ramificações formadas pelos dendrogramas das Figuras 4 e 5.

Os resultados obtidos na caracterização através do MLST reafirmam a grande variabilidade deste agente bacteriano, fato já observado nas análises de PFGE e nos perfis de resistência.

Tabela 6 - Frequência de estirpes de *H. parasuis* apresentando multirresistência aos antimicrobianos testados

Ident.	Ano	Sítio	Animal	Granja	Município	Estado	<i>6pgd</i>	<i>atpD</i>	<i>frdB</i>	<i>g3pd</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>rpoB</i>	STs novos	Nearest match - STs (3, 4 or 5 loci)
GHP 06 (167)	2009	Pulmão	A4	G3	Videira	SC	27	2	2	13	NA (31)	24	3	149	73, 98
GHP 10 (168)	2010	Pericárdio	A6	G6	Carambeí	PR	1	1	NA (13)	NA (3)	NA (11)	1	1	150	2, 5, 6, 8
GHP 45 (169)	2011	Pulmão	A24	G21	Abadiânia	GO	1	14	1	NA (3)	11	3	1	151	5, 15, 42, 62, 91, 97, 131 145
GHP 85 (170)	2012	Cérebro	A46	G32	Maringá	PR	21	7	2	3	1	31	16	152	10, 70, 148
GHP 87 (171)	2012	Pulmão	A48	G33	Leme	SP	NA (36)	4	7	3	2	6	9	153	26, 56, 96, 101, 107
GHP 90 (172)	2012	Pulmão	A51	G36	Rio do Sul	SC	3	1	3	1	NA (29)	1	1	154	95
GHP 100 (173)	2013	Pulmão	A61	G40	Descalvado	SP	3	2	3	3	13	6	1	155	118
GHP 122 (174)	2014	Pulmão	A83	G53	Capela Alto	SP	1	1	3	1	11	1	1	156	2, 5, 6, 24, 95
GHP 148 (175)	2014	Pulmão	A85	G55	Sorriso	MT	4	4	2	1	4	4	9	157	7, 92

6 DISCUSSÃO

A sorotipagem foi uma das primeiras técnicas a ser desenvolvida para o estudo de *H. parasuis* originando as classificações iniciais que buscavam correlacionar as características capsulares proteicas de cada estirpe com correspondente virulência ou patogenicidade. De acordo com Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992), foram determinados 15 sorotipos distintos para o agente. No entanto, restam de 15 a 41% de isolados classificados como não sorotificáveis pelas técnicas convencionais e que podem ou não ocasionar doença. A dificuldade em sorotipificar estas amostras pode estar relacionada ao método de classificação, seja a imunodifusão (KRG) ou a técnica de hemaglutinação indireta, assim como a elevada heterogenicidade do agente (MOROZUMI; NICOLET, 1986; RAPP-GABRIELSON; GABRIELSON; SAHAMBER, 1992). Alguns autores relatam a ocorrência de alterações ou perdas de proteínas da cápsula decorrente de sucessivas reativações, e descrevem maior frequência destas alterações em isolados de origem pulmonar, outros sugerem que a impossibilidade de sorotipificar parte dos isolados esteja relacionada à existência de mais sorotipos além dos 15 descritos, a classificação das estirpes nos sorotipos utilizando a reação em cadeia pela polimerase em estudos futuros poderá esclarecer se há novos sorotipos em circulação (OLIVEIRA; BLACKALL; PIJOAN, 2003; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004).

Os sorotipos de maior prevalência mundial são 4, 5 e 13, os quais são descritos possuindo uma patogenicidade moderada a alta sendo, portanto, envolvidos nos quadros de poliserosite (KIELSTEIN; RAPP-GABRIELSON, 1992; BLACKALL et al., 1996; RUBIES et al., 1999; ANGEN et al., 2004; TADJINE et al., 2004). Na China, Zang et al. (2012) também descrevem entre os mais presentes os sorotipos 2, 15 e 12. No presente estudo estes também foram os sorotipos mais frequentes, sendo que o sorotipo 4 apareceu em maior número de estirpes (21,3%), seguido pelo 5 (12,9%), 13 (9,4%), 14 (7,7%) e 1 (1,7%). Quando comparamos os dados deste estudo com os dados brasileiros mais antigos, identificados por Castilla et al. (2011) os resultados mantiveram-se semelhantes, havendo apenas a alternância dos sorotipos 14 e 13 na frequência de identificação.

A sorotipagem das estirpes revelou uma alta frequência de estirpes não tipáveis através do teste de imunodifusão, representando um total de 47% das estirpes. Este resultado é similar ao descrito por Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992).

Em vários casos foram isoladas estirpes de diferentes sorotipos do mesmo animal (Tabela 1), nestes casos detectou-se os sorotipos 4/5 (4 animais) e 4/14 (1 animal). Vários autores relatam a ocorrência de mais de um sorotipo em um mesmo rebanho ou até no mesmo animal (SMART; MINIATS; MACINESS, 1988; SMART; MINIATS, 1989; OLIVEIRA; BLACKALL; PIJOAN, 2003).

O presente estudo revelou uma alta frequência de multirresistência dos isolados de *H. parasuis* isolados no Brasil, chegando a 93,16%. Resultado superior aos descritos por Martín de La Fuente et al. (2007) para isolados da Espanha (57,6%) e do Reino Unido (3,3%) e por Zhou et al. (2010) para isolados da china (23,6%).

Este estudo conta com estirpes isoladas entre 2009 e 2014, enquanto os estudos citados avaliaram estirpes anteriores a 2010. O aumento na pressão de seleção pelo excessivo uso de antibióticos nos últimos anos no Brasil pode estar relacionado à alta ocorrência de multirresistência. Sabe-se que a seleção de estirpes resistentes ocorre de forma mais eficiente quando há alta pressão do uso de antibióticos ao longo do tempo (MAROSEVIC et al., 2014).

Em relação aos beta-lactâmicos pode-se observar que os valores identificados nas estirpes brasileiras são inferiores apenas aos da Espanha, tabela 7, para ampicilina (20,51 ante 56,7) e ceftiofur (2,56 ante 6,7), no entanto o índice de resistência para penicilina foi superior no Brasil. A resistência a beta-lactâmicos na Espanha foi associada à identificação de plasmídeos pB1000 expressando a β -lactamase ROB-1 (SAN MILLAN et al., 2007). A caracterização dos mecanismos de resistência associados deve ser o próximo passo no entendimento da resistência aos beta-lactâmicos por *H. parasuis* no Brasil.

Os índices de resistência a oxitetraciclina no presente estudo (38,47%) são semelhantes aos descritos na Espanha (40%), ambos considerados elevados quando comparados aos encontrados no Reino Unido (6,7%). Uma questão a ser observada e futuramente investigada é a presença de plasmídeos pHS-Tet e pHS-Rec portando o gene *tet(B)* que já foram identificados em amostras de *H. parasuis* resistente a tetraciclina na Austrália (LANCASHIRE et al., 2005).

Ao se comparar os resultados das fluorquiolonas, as amostras brasileiras mantem-se mais sensíveis a enrofloxacina que as chinesas, contudo mais resistentes que as da Espanha e do Reino Unido. Embora não seja possível comparar, é importante ressaltar que as amostras brasileiras apresentaram alta resistência a danofloxacina (95,72%), fluorquinolona de uso veterinário que não foi testada em outros estudos.

Os aminoglicosídeos, gentamicina, neomicina e espectinomicina apresentaram resultados semelhantes aos chineses e ingleses e inferiores aos espanhóis. Observou-se baixa resistência a florfenicol no Brasil (2,56%), mas esta foi superior ao descrito Espanha, China e Reino Unido e de acordo com a literatura consultada é o primeiro relato de resistência a florfenicol em *H. parasuis*.

Tabela 7 - Distribuição do perfil de resistência aos antimicrobianos de *H. parasuis* isolados no Brasil, Espanha, Reino Unido e China realizados por concentração inibitória mínima

Antimicrobiano	Resistência em % por país			
	Brasil	Espanha*	Reino Unido*	China*
Ampicilina	20,51	56,7	6,7	9,1
Ceftiofur	2,56	6,7	0	0
Penicilina	77,7	60	0	6,4
Oxitetraciclina	38,47	40	6,7	NT
Clortetraciclina	25,64	NT	NT	NT
Danofloxacina	95,72	NT	NT	NT
Enrofloxacina	45,29	20	0	70,9
Gentamicina	0	6,7	0	6,4
Neomicina	16,23	30	20	NT
Espectinomicina	5,12	23,3	10	10
Florfenicol	2,56	0	0	0
Sulfadimetoxina	88,03	0	0	NT
Cotrimoxazol	60,68	53	10	44,5
Clindamicina	50,42	0	0	NT
Tiamulina	1,7	40	3,3	0,9
Tilmicosina	17,09	40	0	0
Tilosina	98,29	0	0	0
Tulatromicina	6,83	NT	NT	NT

* Valores na Espanha e Reino Unidos descritos por Martín de la Fuente et al. (2007) e na China por Zhou et al. (2010). NT- não testado

A resistência a sulfadimetoxina e a associação trimetoprima/ sulfametoxazole fois mais elevada nas estirpes aqui avaliadas. Observou-se resistência a sulfadimetoxina em 88,03% dos casos no Brasil e não houve relato de resistência a este princípio na Espanha e Reino Unido. Com relação à clindamicina, observou-se que no Brasil mais de 50% das estirpes são resistentes, enquanto não foi observada resistência na Espanha e no reino Unido. No entanto, de la Fuente et al. (2007) indicaram que as amostras obtiveram MIC₅₀ e MIC₉₀ próximas do dos pontos de corte seguidos naquele estudo.

As amostras da Espanha apresentaram alta taxa de resistência a tiamulina (40%), resultado que não se repetiu nas amostras do Reino Unido (3,3%), do Brasil (1,7%) ou China (0,9%). Este resultado pode ser justificado pelo alto uso deste antibiótico na Espanha para tratamento das doenças respiratórias de suínos, principalmente a pleuropneumonia suína causada por *Actinobacillus pleuropneumoneae* (GUTIÉRREZ et al., 1993).

Em relação aos macrolídeos não foi registrada a resistência no Reino Unido e na China, contudo na Espanha 40% das amostras foram resistentes a tilmicosina enquanto no Brasil este índice foi de 17,9%. De la Fuerte et al. (1997) indica que esta resistência da tilmicosina na Espanha deve ser justificada pelo uso desse antibiótico até 1999 como promotor e crescimento. O contrário observou-se com relação à tilosina, uma vez em que no Brasil quase a totalidade das amostras foram resistentes (98,29%) e na Espanha todas foram sensíveis.

Várias técnicas têm sido avaliadas para caracterização de estirpes de *H. parasuis*. Smart et al. (1993) descrevem a utilização da técnica de restrição enzimática REP. Blackall et al. (1997) analisaram estirpes do agente através técnica de MEE. Rafiee et al. (2000) utilizaram a ERIC-PCR e Ruiz et al. (2001) o perfil de proteínas da membrana externa para determinar o perfil genético de isolados não tipificáveis pelo método KRG. De la Puente et al. (2003) utilizaram a técnica de RFLP após a amplificação do gene *tbpA*, o qual codifica uma proteína da membrana externa. Olvera et al. (2006) relatam a realização do sequenciamento parcial do gene *hs p60* como um marcador molecular para *H. parasuis*.

O uso do PFGE utilizando a enzima de restrição *RsrII* não possibilitou a caracterização de todas as estirpes no presente estudo. Dentre as 76 estirpes avaliadas foi possível identificar 67 perfis diferentes, resultando num índice discriminatório igual a 0,99. A pulverização das estirpes em diferentes perfis e grupamentos não permite nenhuma associação dos grupos com os dados de origem, sorotipo ou perfil de resistência. A grande pulverização das amostras em muitos perfis diferentes para um mesmo sorotipo, por exemplo, também foi observado por Zang et al. (2012) que teve um índice discriminatório calculado pelo Índice de Simpson de

0,992 onde identificaram 89 perfis diferentes de PGFE para as 112 amostras de *H. parasuis* utilizadas

O mesmo tipo de situação foi observado na análise das nove estirpes selecionadas através do MLST. Todas as estirpes nacionais geraram novos STs diferentes dos já depositados no site que faz a curadoria dos dados (<http://pubmlst.org/hparasuis/>) e quando as sequencias são comparadas as estirpes dos diferentes países, as estirpes Brasileiras ficam distribuídas nos diferentes grupos reforçando a alta diversidade genética descrita nesta espécie bacteriana. No entanto a baixa correlação entre as amostras brasileiras, identificada e nosso estudo, pôde ser observado em estudos anteriores, como no caso de Mullins et al. (2013) que também observaram grande quantidade de STs de *H. parasuis* identificados e, em alguns casos, mais de um na mesma granja. Em muitos casos as análises de MLST não agruparam separadamente estirpes virulentas de avirulentas ou de regiões geograficamente mais próximas de outras mais distantes. De acordo com Turner e Feil (2007) a indicação do uso do MLST é de identificar características genéticas um isolado e não seu potencial de virulência, em alguns casos, a correlação da caracterização genética e de atributos que caracterizam a virulência ou sorotipos poderão acontecer. O MLST depende da neutralidade dos genes *housekeepings* e esta característica revelará mais traços de ancestralidade entres as estirpes que independem muitas vezes de suas características fenotípicas.

As nove estirpes selecionadas foram submetidas ao sequenciamento completo do genoma o que possibilitará em estudos futuros uma análise mais apurada dos dados e da presença de possíveis genes de virulência ou resistência. Os estudos envolvendo a análise e curadoria destes genomas serão conduzidos nos próximos meses pelo nosso grupo de pesquisa.

7 CONCLUSÕES

- As estirpes de *H. parasuis* isoladas de suínos da região centro-sul do Brasil pertenceram aos sorotipos 4, seguido do 5, 13, 14 e do 1 respectivamente, dados compatíveis foram identificados em várias partes do mundo e em estudos anteriores no Brasil.
- As estirpes estudadas apresentaram alta resistência a tilosina, danofloxacina, sulfadimetoxina, penicilina, cotrimoxazol e clindamicina.
- Uma alta porcentagem de estirpes apresentou multirresistência.
- Todas as estirpes apresentaram o gene de virulência *vtA*.
- As estirpes apresentaram uma alta variabilidade quando avaliadas pela PFGE.
- Dentre as nove amostras analisadas, todas foram caracterizadas como novos STs, sendo as primeiras amostras brasileiras depositadas no site <http://pubmlst.org/hparasuis/>.
- Quando se compara as nove amostras brasileiras com as estirpes identificadas em outras partes do mundo, elas se distribuem em diferentes agrupamentos e se misturam com estirpes de outros países, confirmando sua variabilidade genética.

8 REFERÊNCIAS

- AMANO, H.; SHIBATA, M.; TAKAHASHI, K.; SASAKI, Y. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 6, 451-455, 1997.
- ANGEN, Ø.; OLIVEIRA, S.; AHRENS, P.; SVENSMARK, B.; LESER, T. D. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Microbiology**, 119, p. 266-276, 2007.
- ANGEN, Ø.; SVENSMARK, B.; MITTAL, K. R. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 103, p. 255-258, 2004.
- BELLO-ORTÍ, B.; DESLANDES, V.; TEMBALAY, Y. D.; LABRIE, J.; HOWELL, K. J.; TUCKER A. W.; MASKELL, D. J.; ARAGON, V.; JACQUES, M. Biofilm formation by virulent and non-virulent strains of *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Research**, v. 45, n. 104, p. 1-14, 2014.
- BIBERSTEIN, E. L.; WHITE, D. C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. **Journal Medical Microbiology**, v. 2, p. 75-78, 1969.
- BLACKALL, P. J.; RAPP-GABRIELSON, V. J.; HAMPSON, D. J. Serological Characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, p. 93-95, 1996.
- BLACKALL, P. J.; TROTT, D. J.; RAPP-GABRIELSON, V.; HAMPSON, D. J. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. **Veterinary of Microbiology**, v. 103, p. 21-27, 2004.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. .; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NORRDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 459-463, 1990.
- CAI, X.; CHEN, H.; BLACKALL, P. J.; YIN, Z.; WANG, L.; LIU, Z.; JIN, M. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 231-236, 2005.
- CASTILLA, K. S.; DE GOBBI, D. D. S.; MORENO, L. Z.; PAIXÃO, R.; COUTINHO, T. A.; DOS SANTOS, J. L.; MORENO, A. M. Characterization of *Haemophilus parasuis*

isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. **Research in Veterinary Science**, v. 92, n. 3, p. 366-371, 2011.

CHEN, H.; LI, C.; FANG, M.; ZHU, M. LI, X.; ZHOU, R.; LI, K.; ZHAO, S. Understanding *Haemophilus parasuis* infection in porcine spleen through a transcriptomics approach. **BMC Genomics**, v. 10, n. 64, p. 1-18, 2009.

CHRINTENSEN, H.; KUHNERT, P.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1601-1609, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals** CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute). 3. ed. Wayne, PA: CLSI, 2008.

DE LA PUENTE REDONDO, V. A.; MÉNDEZ, J. N.; GARCÍA DEL BLANCO, N.; BORONAT, N. L.; MARTÍN, C. B. G.; FERRI, E. F. R. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of *tbpA* gene. **Veterinary of Microbiology**, v. 92, p. 253-262, 2003.

CHU, Y. F.; GAO, P. C.; ZHAO, P.; ZHANG, N. Z.; LIU, Y. S.; LIU, J. X.; LU, Z. X. Genotyping of *Haemophilus parasuis* isolated from northwest China using PCR-RFLP based on the *ompA* gene. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 3, p. 337-343, 2011.

FERRI, E. F. R.; MARTÍNEZ, S.; FRANDOLOSO, R.; YUBERO, S.; MARTÍN, C. B. G. Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and Carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and 5. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 385-389, 2010.

GUO, L.; ZHANG, J.; XU, C.; ZHAO, Y.; REN, T.; ZHANG, B.; FAN, H.; LIAO, M. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in south China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 539-542, 2011.

GUTIÉRREZ, C. B.; PÍRIZ, S.; VADILLO, S.; RODRÍGUEZ-FERRE, E. F. In vitro susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoneae* strains to 42 antimicrobial agents. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 546-550, 1993

HOWELL, K. J.; PETERS, S. E.; WANG, J.; HERNANDEZ-GARCIA, J.; WEINERT, L. A.; LUAN, S.; CHAUDHURI, R. R.; ANGEN, Ø.; ARAGON, V.; WILLIANSO, R. R.; PARKHILL, J.; LONGFORD, P. R.; RYCROFT, A. N.; WREN, B. W.; MASKELL, D. J.; TUCKER, A. Development of a multiplex PCR assay for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 13, p. 3812-3821, 2015.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1903-1905, 1990.

KIELSTEIN, P.; RAPP-GABRIELSON, V. J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 862-865, 1992.

LACASHIRE J. F.; TERRY, T. D.; BLACKALL, P. J.; JENNINGS, M. P. Plasmid-encoded Tet B Tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1927-1931, 2005.

LITTLE, T. W. *Haemophilus infection*. **The Veterinary Records**, v. 87, p. 399-402, 1970.

MACEDO, N. R.; OLIVEIRA, S. R.; LAGE, A. P.; SANTOS, J. L.; ARAÚJO, M. R.; GUEDES, R. M. C. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. **The Veterinary Journal**, v. 188, p. 362, 2011.

MAROSEVIC, D.; CERVINKOVA, D.; VLKOVA, H.; VIDENSKA, P.; BABAK, V.; JAGLIC, Z. In vivo spread of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance - a model study in chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3-4, p. 388-396, 2014

MARTÍN DE LA FUENTE, A.J.; TUCKER, A.W.; NAVAS, J.; BLANCO, M.; MORRIS, S. J.; GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 184-191, 2007

MENIN, A.; GAVA, D.; VAZ, E. K. Aspectos gerais sobre a infecção por *Haemophilus parasuis* em suínos – Revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, n. 2, p. 148-156, 2005.

MILLAN, A. M.; ESCUDERO, J. A.; CATALAN, A.; NIETO, S.; FARELO, F.; GIBERT,; MORENO, M. A.; DOMINGUEZ, L.; GONZALES-ZORN, B. β -Lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid bearing *bla*_{ROB-1}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2260-2264, 2007.

- MOLLER, K.; ANDERSEN, L. V.; CHRISTENSEN, G.; KILIAN, M. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 36, p. 261-271, 1993.
- MORENO, L. Z.; CASTILLA, K. S.; DE GOBBI, D. D.; COUTINHO, T. A.; FERREIRA, T. S.; MORENO, A. M. ERIC-PCR genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1420-1426, 2011.
- MOROZUMI, T.; NICOLET, J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1022-1025, 1986.
- MULLINS, M. A.; REGISTER, K. B.; BRUNELLE, B. W.; ARAGON, V.; GALOFRÉ-MILA, N.; BAYLES, D. O.; JOLLEY, K. A. A curated public databases for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on a optimized typing scheme. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 899-906, 2013
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 658 p.
- OLIVEIRA, S.; BLACKALL, P. J.; PIJOAN, C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 435-442, 2003.
- OLIVEIRA, S.; GALINA, L.; PIJOAN, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infection. **Journal of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v. 13, n. 6, p. 495-501, 2001.
- OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 1-12, 2004.
- OLVERA, A.; CALSAMIGLIA, M.; ARAGON, V. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3984- 3992, 2006.
- OLVERA, A.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; ARAGON, V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. **Microbiology**, v. 152, p. 3683-3690, 2006.

OLVERA, A.; PINA, S.; PÉREZ-SIMÓ, M.; OLIVEIRA, S.; BENSALD A. Virulence-associated trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis* are antigenic proteins *in vivo*. **Veterinary Research**, v. 41 n. 26, p. 455-459, 2010.

RAFIEE, M.; BARA, M.; STEPHENS, C. P.; BLACKALL, P. J. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 12, p. 846-849, 2000.

RAPP-GABRIELSON, V. J. *Haemophilus parasuis*. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Disease of swine**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2000. p. 474-481.

RAPP-GABRIELSON, V. J.; GABRIELSON, D. A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 5, p. 659-664, 1992.

RAPP-GRABIELSON, V. J.; GABRIELSON, D. A.; SCHAMBER, G. J. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 987-994, 1992.

RUIZ, A; OLIVEIRA, S.; TORREMORELL, M.; PIJOAN, C. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1757-1762, 2001.

RÚBIES, X.; KIELSTEIN, P.; COSTA, LI.; RIERA, P.; ARTIGAS, C.; ESPUÑA, E. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 245-248, 1999.

SAN MILLAN, A.; ESCUDERO, J. A.; CATALAN, A.; NIETO, S.; FARELO, F.; GIBERT, M.; MORENO, M. A.; DOMINGUEZ, L.; GONZALES-ZORN, B. Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis* Is mediated by plasmid pB1000 bearing bla_{ROB-1}. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 51, n. 6, p. 2260-2264, 2007.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; SOLANO, G. I.; PIJOAN, C. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 3, p. 237-243, 1997.

SMART, N. I.; MINIATS, O.P.; MACINESS, J. I. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates

from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 319-324, 1988.

SMART, N. L.; MINIATS, O. P. Preliminary Assessment of a *Haemophilus parasuis* Bacterin for use in specific pathogen free swine. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 3990-3993, 1989.

SMART, N. I.; MINIATS, O. P.; MACINESS, J. I. An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne**, v. 34, n. 8, p. 487-490, 1993.

SILVA, G. F. R.; 1 de janeiro de 2016.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORANO, A. M.; ROEHE, P. M. Doença de Glässer. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: A3 Impressos Especiais, 1999. p. 119-122.

TADJINE, M.; MITTAL, K. R.; BOURDON, S.; GOTTSCHALK, M. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. **Microbiology**, v. 150, p. 3935-3945, 2004.

TURNER, K. M. E.; FEIL, E. J. The secret life of the multilocus sequence typing. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 129-135, 2007.

VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrums deprived (CDCD) swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 200-206, 1997.

ZHANG, J.; XU, C.; GUO, L.; KE, B.; KE, C.; ZHANG, B.; DENG, X. L.; LIAO, M. A rapid pulsed-field gel electrophoresis method of genotyping *Haemophilus parasuis* isolates. **Applied Microbiology**, v. 52, p. 589-595, 2011.

ZANG, J.; XU, C.; GUO, L.; SHEN, H.; DENG, X.; KE, C.; KE, B.; ZANG, B.; LI, A.; REN, T.; LIAO, M. Prevalence and characterization of genotyping diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 76, p. 224-229, 2012.

ZHOU, X.; XU, X.; ZHAO, Y.; CHEN, P.; ZHANG, X.; CHEN, H.; CAI, X. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 141, p. 168-173, 2010.