BÁRBARA LETÍCIA PEREIRA COSTA

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados
de *Actinobacillus pleuropneumoniae*
provenientes de diferentes estados brasileiros**

São Paulo
2017

BÁRBARA LETÍCIA PEREIRA COSTA

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados
de *Actinobacillus pleuropneumoniae*
provenientes de diferentes estados brasileiros**

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 a obtenção do título de Doutora em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Andrea Micke Moreno

São Paulo
2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3464
FMVZ

Costa, Bárbara Letícia Pereira

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros. / Bárbara Letícia Pereira Costa . -- 2017.
55 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 2. Sorotipagem. 3. AFLP. 4. PFGE. 5. Resistência.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Análise fenotípica e genotípica de amostras de *Streptococcus suis* isoladas suínos no Brasil”, protocolado sob o nº 3102/2013, utilizando 150 (cento e cinquenta) suínos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fernando Ferreira, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e 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.

We certify that the Research “Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus suis* strains from swine in Brazil”, protocol number 3102/2013, utilizing 150 (one hundred fifty) swine, under the responsibility Prof. Dr. Fernando Ferreira, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and 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.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: COSTA, Bárbara Letícia Pereira

Título: Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros

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 a obtenção do título de Doutora 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: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar com saúde, alegria e força.

Agradeço ao meu marido Demian, que esteve ao meu lado durante todo o período envolvido neste estudo, me dando muito apoio e carinho.

Agradeço à minha mãe, Consolação, que mesmo à distância não falhou em me estimular e não mediu esforços no apoio aos meus estudos.

Ao meu pai, Marco Tulio, e aos meus irmãos, André e Paulinho, por se alegrarem com mais essa conquista.

À Professora Dra. Andrea Moreno, por ter dado a mim a oportunidade de trabalhar em um laboratório tão desenvolvido e organizado e de estudar em uma universidade tão conceituada. Agradeço por sua acolhida, confiança, orientação, amizade e por seu exemplo como profissional.

À Dra. Adrienny Reis, pelo incentivo, confiança e por despertar o meu interesse na promissora área da suinocultura.

À Ana Paula, pelo grande auxílio nos isolamentos bacterianos.

À Luisa, pelo auxílio na análise dos resultados e contribuições na revisão do texto.

A todos os amigos que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia, que de alguma maneira me ajudaram contribuindo para esse estudo: Vasco, Maria Roberta, Maria Gabriela, Marina, Pedro, Ana Paula, Carlos, Luisa, Rosi, Alexandre, Ketrin, Jucélia, Givago, Mirela, Débora, Thaís, Fabiana e D. Rose.

À CAPES, pelo apoio ao projeto realizado.

A todos os professores, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Às minhas queridas tias Auxiliadora, Madalena e Margarida, pelas constantes orações.

Às minhas queridas amigas que estiveram ao meu lado em mais uma conquista: Clara, Nathalia, Julia M., Julia B., Juliana, Mariana P., Mariana A., Gabriela e Flávia.

RESUMO

COSTA, Bárbara Letícia Pereira. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros**. [Phenotypic and genotypic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from different Brazilian states]. 2017. 55 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, doença conhecida como pleuropneumonia suína, assumiu grande importância na suinocultura moderna devido à alta ocorrência observada nos rebanhos. O impacto da doença está relacionado à capacidade do agente em causar pneumonia severa, levando os animais a óbito ou doença crônica, resultando em graves prejuízos zootécnicos. Diante desse cenário, o controle e monitoramento do agente se faz importante por meio da identificação dos diferentes sorotipos, da análise genética e da determinação dos perfis de resistência aos antimicrobianos. O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isoladas a partir de quadros de pneumonia em suínos. Um total de 85 estirpes de *A. pleuropneumoniae* foram submetidas a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação e sorotipagem, determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos, polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os sorotipos mais frequentes foram: 5 (38,8%), 10 (29,4%), 7 (5,9%), 8 (5,9%) e 6 (3,5%), sendo que 14 (16,5%) estirpes foram não tipáveis. Foi observada alta heterogeneidade de perfil genético entre as estirpes analisadas, tanto pelo AFLP quanto pelo PFGE, e o índice discriminatório para cada técnica foi 0,97 e 0,84, respectivamente. Todas as estirpes foram sensíveis ao ceftiofur, gentamicina, tulatromicina e tilmicosina, sendo que 98,8% das estirpes foram resistentes à tilosina e altas taxas de resistência foram observadas ainda para as tetraciclinas, clindamicina e sulfadimetoxina.

Palavras-chave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Sorotipagem. AFLP. PFGE. Resistência.

ABSTRACT

COSTA, Bárbara Letícia Pereira. **Phenotypic and genotypic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from different Brazilian states.** [Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros]. 2017. 55 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Infection by *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a disease known as swine pleuropneumonia, has gained greater relevance to modern pig farming due to the high recurrence rate observed in herds. The impact of the disease relates to the capacity of the agent to cause severe pneumonia, leading to animal death or chronic conditions, thus resulting in severe zootechnical losses. In view thereof, the control and monitoring of the agent is key, being performed through the identification of different serotypes, genetic analysis and determination of antimicrobial resistance profiles. The objective of this study was to characterize phenotypically and genotypically *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from swine with clinical presentation of pneumonia. A total of 85 strains of *A. pleuropneumoniae* were subject to polymerase chain reaction (PCR) for identification and serotyping, determination of the minimal inhibitory concentration, amplified fragment length polymorphism (AFLP) and pulsed field gel electrophoresis typing techniques (PFGE). Most recurring serotypes were: 5 (38.8%), 10 (29.4%), 7 (5.9%), 8 (5.9%) and 6 (3.5%), of which 14 (16.5%) strains were nontypeable. High genetic heterogeneity was observed for both AFLP and PFGE, and the discriminatory index for each technique was 0.97 and 0.84, respectively. All 85 strains were susceptible to ceftiofur, gentamicin, tulatromycin and tilmicosin, 84 of which were resistant to tylosin, and high resistance rates were also observed for clindamycin, tetracyclines and sulfadimethoxine.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Serotyping. AFLP. PFGE. Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de distribuição dos antimicrobianos no painel BOPO6F Sensititre® (<i>TREK Diagnostic Systems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA</i>)	28
Figura 2 –	Dendograma obtido a partir da análise de estirpes de <i>A. pleuropneumoniae</i> por meio do AFLP com enzima de restrição <i>Hind III</i>	36
Figura 3 –	Dendograma obtido a partir da análise de estirpes de <i>A. pleuropneumoniae</i> por meio da PFGE com enzima de restrição <i>Apal</i>	38
Figura 4 –	Dendograma obtido a partir da análise de estirpes de <i>A. pleuropneumoniae</i> de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers empregados na identificação de <i>A. pleuropneumoniae</i>	24
Tabela 2 – Critério utilizados para a análise dos resultados da CIM (pontos de corte)	30
Tabela 3 – Frequência de estirpes por estado e ano de isolamento.....	32
Tabela 4 – Frequência de sorotipos.....	33
Tabela 5 – Distribuição de sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i> entre as estirpes estudadas de acordo com o ano de isolamento – 2006 a 2013	33
Tabela 6 – Distribuição de sorotipos de <i>A. pleuropneumoniae</i> entre as estirpes estudadas por estado	34
Tabela 7 – Frequência de estirpes multirresistentes de acordo com os períodos avaliados.	39
Tabela 8 – Distribuição dos valores de CIM obtidos dentre as 85 cepas avaliadas, valores de CIM 50, CIM 90 e frequência de cepas resistentes.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sítio de restrição da enzima <i>Hind III</i> e sequências de nucleotídeos dos adaptadores ADH1 e ADH2 e do iniciador HI-G.....	26
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	HISTÓRICO	13
2.2	ETIOLOGIA	13
2.3	PATOGENICIDADE	14
2.4	EPIDEMIOLOGIA	16
2.5	SINAIS CLÍNICOS	17
2.6	DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE	18
2.6.1	Microbiológico	19
2.6.2	Bioquímico	19
2.6.3	Métodos moleculares	20
2.6.4	Resistência aos antimicrobianos	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAL E MÉTODO	23
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS	23
4.2	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	24
4.2.1	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	24
4.2.1.1	Identificação	24
4.2.1.2	Sorotipagem molecular	25
4.2.2	Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)	25
4.2.3	Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	27
4.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	28
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4.4.1	Análise descritiva	30
4.4.2	Análise dos fragmentos amplificados e análise de agrupamento da PFGE	31
5	RESULTADOS	32
5.1	IDENTIFICAÇÃO E SOROTIPAGEM MOLECULAR	32
5.2	POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	34
5.3	ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)	37
5.4	PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	39
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae*) é um agente infeccioso difundido mundialmente. Os primeiros casos clínicos de pleuropneumonia suína no Brasil foram descritos na década de 80. Desde então muitos esforços são destinados ao controle da doença por meio de pesquisas em diagnóstico, criação de vacinas e estratégias de erradicação.

A pleuropneumonia suína causa grave prejuízo para a cadeia de produção suinícola no Brasil e no mundo. A mortalidade, os gastos com vacinas e medicamentos para prevenção e tratamento da doença representam considerável parcela destes prejuízos. Ambas as formas de infecção, aguda e crônica, são importantes e estão relacionadas à perda econômica. A forma aguda pode evoluir a óbito e a forma crônica causa emagrecimento e condenações no abatedouro por lesões patológicas.

A identificação dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae* tornou-se importante para a avaliação da distribuição geográfica do agente e posterior atuação do médico veterinário na prevenção e controle da doença. Nota-se que nos últimos 20 anos, poucos dados sobre a distribuição dos sorotipos nos países produtores de suínos foram publicados, desta forma, não é possível avaliar se a distribuição dos sorotipos permanece a mesma ou se modificou pelo uso das vacinas comerciais ou autógenas. Atualmente há um grande número de estudos sobre a caracterização genética desta espécie bacteriana com o intuito de elucidar o papel de genes relacionados à virulência e resistência os antimicrobianos usados na prevenção e controle da infecção por *A. pleuropneumoniae*.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isoladas de suínos provenientes de diferentes estados brasileiros entre os anos de 2006 e 2013. A caracterização fenotípica foi baseada na análise do perfil de resistência a antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções em suínos. A caracterização genotípica baseou-se na identificação e sorotipagem das estirpes envolvidas, caracterização das cepas pelo Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados (AFLP) e da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A doença pleuropneumonia suína e o agente causador *Actinobacillus pleuropneumoniae* têm sido objetos de estudo desde meados da década de 1960. O primeiro relato da doença ocorreu em abril de 1961 na cidade de La Plata, Argentina, onde um surto causou a morte súbita de 260 animais pesando em sua maioria entre 20 e 60 quilos, além de acometer alguns suínos adultos. Na época, de acordo com os achados clínicos, a doença foi reconhecida como pleuropneumonia suína contagiosa (SHOPE, 1964).

Haemophilus pleuropneumoniae foi o nome científico proposto por Shope (1964) após isolar a bactéria dependente de NAD ou fator V (nicotinamida adenina dinucleotídeo) de pulmão suíno com extensa pneumonia lobar acompanhada de pleurite fibrinosa. A espécie bacteriana foi, posteriormente, nomeada *Actinobacillus pleuropneumoniae* devido a conclusão de estudos de similaridade genética relacionados à espécie *Actinobacillus lignieresii* (POHL et al., 1983).

Estirpes não dependentes de NAD, também classificadas como *A. pleuropneumoniae* biotipo 2, foram descritas por Bertschinger, em 1978, como “*Pasteurella haemolytica-like*”. Cinco anos mais tarde concluiu-se que estas estirpes apresentavam alta semelhança fenotípica às estirpes de *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, descrita na época como *Haemophilus pleuropneumoniae*. Além disso, identificaram grande proximidade filogenética, não justificando a criação de uma subespécie (SCHALLER et al., 1999).

2.2 ETIOLOGIA

Actinobacillus pleuropneumoniae é uma bactéria Gram-negativa que se caracteriza morfológicamente como um coco-bacilo pequeno que se apresenta sozinho, em pares ou em cadeia curta. Macroscopicamente, uma colônia mede,

aproximadamente, 3 mm de diâmetro e exibe cor branca acinzentada com brilho suave (POHL et al., 1983).

As estirpes de *A. pleuropneumoniae* podem ser classificadas de acordo com o biotipo, sorotipo e perfil de toxinas Apx. Biotipos I e II se diferem na dependência de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para o crescimento, sendo que o biotipo I é dependente e II independente. Os sorotipos diferem de acordo com a cápsula polissacarídica (CPS) e lipopolissacarídeo de parede celular (LPS) (HAESEBROUCK et al., 1997). As estirpes de *A. pleuropneumoniae* biotipo I se distribuem em 13 sorotipos (sorotipos 1 a 12 e 15) e o biotipo II em apenas dois sorotipos (13 e 14), totalizando 15 sorotipos (BLACKALL et al., 2002). As toxinas Apx são agrupadas de acordo com a presença dos genes codificadores das toxinas ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV (FREY, 2003). Todas as estirpes de *A. pleuropneumoniae* contêm genes para a produção da toxina ApxIV, sendo que esta é altamente específica para a bactéria *A. pleuropneumoniae* (SCHALLER et al., 1999).

2.3 PATOGENICIDADE

A patogênese da pleuropneumonia suína é considerada complexa, uma vez que o agente apresenta vários fatores de virulência: polissacarídeo capsular (CPS), lipopolissacarídeo (LPS), proteínas de membrana e exotoxinas (FREY, 1995).

O agente causador invade o sistema respiratório pela via aerógena, adere preferencialmente às células epiteliais ciliadas dos bronquíolos terminais e epitélio alveolar.

O CPS apresenta propriedades antifagocíticas que protegem as bactérias das defesas celulares do hospedeiro. Estudos em que houve a retirada da capsula de estirpes de *A. pleuropneumoniae*, demonstraram a impossibilidade do agente em induzir doença clínica ou lesões pulmonares, o que demonstra que a cápsula é essencial para a virulência de *A. pleuropneumoniae in vivo*. CPS é considerado fator de virulência que permite que a bactéria resista aos mecanismos antibacterianos produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (FENWICK; OSBURN; OLANDER, 1986; DUBREUIL et al., 2000).

O componente oligossacarídeo do LPS parece desempenhar um importante papel na aderência do *A. pleuropneumoniae* às células do suíno (CHIERS et al., 2010). Uma vez que a bactéria está presente nos alvéolos, o sistema imune do hospedeiro atuará contra os fatores de virulência de *A. pleuropneumoniae* determinando ou não a ocorrência de pleuropneumonia. O LPS atrai fortemente macrófagos e neutrófilos, além de estimular os macrófagos alveolares a secretarem citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas ativam macrófagos e aumentam a permeabilidade vascular permeando os alvéolos com imunoglobulinas G (IgG), anticorpos maternos, vacinais ou de anterior exposição (CHO et al., 2005).

Outros importantes fatores envolvidos na virulência do agente são as exotoxinas ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV. A ApxI é fortemente hemolítica e citotóxica. A ApxII é fracamente hemolítica e possui uma citotoxicidade moderada. A ApxIII não é hemolítica, porém é fortemente citotóxica. Todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* produzem uma ou duas destas toxinas (HAESEBROUCK et al., 2004). Em geral, estirpes de sorotipos 1, 5 e 9 produzem ApxI e ApxII; estirpes de sorotipos 2, 3, 4, 6, 8 e 15 produzem ApxII e ApxIII; estirpes de sorotipos 7, 12 e 13 produzem apenas ApxII; e estirpes de sorotipos 10 e 14 produzem apenas ApxIII (GOTTSCALK; BROES; FITTIPALDI, 2003). Uma quarta toxina, ApxIV, é produzida, *in vivo*, por todos os sorotipos (SCHALLER et al., 1999).

O dano pulmonar extenso está relacionado ao estímulo de células inflamatórias do hospedeiro pelo LPS e principalmente ao efeito combinado de citotoxinas Apx em diferentes células pulmonares (HAESEBROUCK et al., 1997; FREY, 2003). A lesão de células endoteliais resulta na ativação da coagulação, formação de microtrombos e necrose isquêmica localizada (BOSSÉ et al., 2002). Na maioria dos casos de pleuropneumonia aguda, a morte é decorrente de choque endotóxico devido absorção de altas concentrações de LPS.

Além dos fatores de virulência citados, estudos mais recentes com o agente indicam que a aderência em forma de biofilme e a resistência aos antimicrobianos são fatores com importante papel na virulência (PEREIRA et al., 2015).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A. pleuropneumoniae é amplamente difundido tendo como principal reservatório o suíno doméstico. Os suínos selvagens e outros suídeos podem ser considerados reservatórios. Em estudo realizado na Eslovênia, 50% dos suídeos de vida livre avaliados apresentaram sorologia positiva para *A. pleuropneumoniae* (VENGUST; VALENCAK; BIDOVEC, 2006)

Suínos de todas as idades são susceptíveis, porém os surtos, geralmente, atingem àqueles entre 70 e 100 dias de idade. Após o surto, com a sobrevivência do animal segue-se a forma crônica afetando, principalmente, os suínos de terminação, com mais de 60 kg. As taxas de morbidade e mortalidade variam de 8,5 a 40% e 0,4 a 24%, respectivamente (BARCELLOS; SOBESTIANSKY, 2007)

A principal fonte de contaminação de *A. pleuropneumoniae* é a introdução de animais provenientes de granjas infectadas em um rebanho livre de doenças (SPF). Dentro de um lote de suínos, a infecção é mantida através do portador assintomático, no qual *A. pleuropneumoniae* localiza-se nos nódulos pulmonares, abscessos e tonsilas. Esses portadores eliminam o agente e infectam outros animais por contato direto, mantendo a infecção no rebanho. Porcas infectadas ou vacinadas desenvolvem imunidade sorotipo específica que, através do colostro, protege seus leitões nas primeiras semanas de vida (GOTTSCALK, 2012).

A transmissão ocorre por via aerógena e através de contato direto entre os suínos mantidos na mesma baia ou baias adjacentes. Em distâncias acima de quatro metros, isso parece não ocorrer, fato também observado quando, entre duas baias, existir uma sem animais (KRISTENSEN et al., 2004).

Surtos de pleuropneumonia têm sido reportados em, praticamente, todos os países da Europa, em diferentes regiões dos Estados Unidos, México, América do Sul, Japão, Coreia, Taiwan e Austrália, além de muitos outros países. Além da ampla distribuição do agente, também existe grande variação dos sorotipos implicados nos surtos, sendo que ainda um mesmo sorotipo pode apresentar alta virulência em determinada região e baixa em outra. (GOTTSCALK, 2012).

No Brasil, a pleuropneumonia suína foi diagnosticada pela primeira vez em 1981. A partir de então, vários surtos foram diagnosticados onde a suinocultura é praticada de forma intensiva e confinada. Atualmente, no país, dos 15 sorotipos de

A. pleuropneumoniae descritos, a maioria foi identificada e os mais frequentes são: 5, 3, 6 e 10 (KUCHIISHI et al., 2007).

A sorotipagem de *A. pleuropneumoniae* é essencial do ponto de vista epidemiológico, bem como para programas de controle e prevenção de surtos envolvendo estirpes altamente virulentas (DUBREUIL et al., 2000).

Além da sorotipagem, muitos esforços em pesquisas foram feitos nos últimos anos para desenvolver e validar técnicas que permitam identificar rebanhos infectados de forma subclínica. A utilização dessas técnicas em programas de vigilância de rebanho de reprodutores permitirá avanços importantes no diagnóstico e na prevenção de infecções por *A. pleuropneumoniae* (ZANELLA; MORÉS; DE BARCELLOS, 2016).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da pleuropneumonia variam de acordo com a idade do animal, com seu estado imune, condições ambientais e níveis de exposição ao agente infeccioso (GOTTSCALK, 2012).

A infecção por *A. pleuropneumoniae* se apresenta de diferentes formas clínicas (NICOLET; KÖNIG, 1966; GOTTSCALK, 2012):

- Forma superaguda: os animais podem ser encontrados mortos nas terminações, sem terem mostrado sintomas prévios. Muitas vezes, apresentam sangue saindo pelas narinas e/ou boca;
- Forma aguda: observa-se anorexia, prostração, hipertermia (40,5-42°C), dificuldade respiratória, tosse profunda e, antecedendo a morte, fluxo sanguinolento nasobucal. Os animais infectados permanecem nos cantos das baias em posição de “cão-sentado” ou em decúbito esternal. Muitas vezes, apresentam-se com a pele avermelhada, devido à cianose e, às vezes, apresentam vômitos;
- Forma crônica: os únicos sintomas observados são a falta de desenvolvimento e acessos esporádicos de tosse. Nesses casos, pode ser observado o aumento

significativo de condenações de carcaças no frigorífico, devido a aderências de pleura e pericárdio.

As lesões de *A. pleuropneumoniae* são encontradas, quase que exclusivamente, na cavidade torácica e podem estar localizadas em um ou ambos os pulmões. Os lobos diafragmáticos e cardíacos são comumente afetados e a pleura adjacente às lesões pulmonares é, invariavelmente, afetada. Os suínos que vem a óbito apresentam áreas de consolidação pulmonar de aspecto hemorrágico, recobertas por espessa camada de fibrina, além da exsudação serofibrinosa a fibrino-sanguinolenta nas cavidades pleural e pericárdica (ROSENDAL; BOYD; GILBRIDE, 1985).

Os animais que sobrevivem à infecção podem ter resolução completa das lesões, apesar de ser mais frequente a observação de focos necróticos, abscessos encapsulados e pleurite (LIGGETT; HARRISON; FARRELL, 1987). Casos crônicos são caracterizados por lesões hemorrágicas subpleurais focais e adesão fibrosa da pleura. Linfonodos traqueobronquial e cervicais podem se apresentar edemaciados e reagentes, como resultado de infiltração neutrofílica e deposição de fibrina (ROSENDAL; BOYD; GILBRIDE, 1985).

Outra consideração importante sobre os sinais clínicos é que estes podem ser exacerbados na presença concomitante de outros agentes infecciosos, tais como *Mycoplasma hyopneumoniae* e vírus Influenza (TOBIAS et al., 2014).

2.6 DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE

Suspeita-se de infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* quando são observados sinais clínicos clássicos e lesões macroscópicas, sendo esta confirmada por meio do isolamento bacteriano e identificação do agente (GOTTSCALK, 2012).

2.6.1 Microbiológico

O isolamento primário de *A. pleuropneumoniae*, a partir de tecidos e secreções, deve ser realizado em ágar sangue de carneiro (5%) com estria de *Staphylococcus aureus*. Após incubação a 37°C em presença de 5% de CO₂, por 24 horas, pode-se observar colônias pequenas, beta-hemolíticas, próximas à estria de *S. aureus* (NAD dependentes) contornada por área de cor clara de completa hemólise. Esta observação confere rápido diagnóstico bacteriológico.

Estirpes de biotipo I não crescem em meio de cultura que não contém NAD. Para o crescimento deve-se adicionar NAD ao meio ou fornecê-lo por meio de estria de *S. aureus*. Portanto, nota-se crescimento do agente próximo à estria, fenômeno denominado satelitismo ou teste de CAMP (Christie, Atkins, and Muench-Petersen). A área de hemólise produzida pelo *A. pleuropneumoniae* contribui para a formação deste fenômeno e está relacionado à presença combinada das toxinas ApxI, ApxII, ApxIII (KILIAN, 1976; JANSEN et al., 1995).

Estirpes de *A. pleuropneumoniae* biotipo II, que crescem independente da presença de NAD no meio de cultura, podem ser identificadas de forma errônea como *Streptococcus suis* ou *Trueperella pyogenes* devido à semelhança das colônias. Sugere-se a realização de testes bioquímicos ou provas moleculares a fim de diferenciar as estirpes. Outra semelhança que pode levar ao diagnóstico incerto é o histórico clínico comum de pleuropneumonia presente também nas infecções por *S. suis* e *T. pyogenes* (MACLNNES; DESROSIERS, 1999). A importância da identificação correta do agente está na abordagem distinta de controle frente às infecções pelos diferentes agentes.

2.6.2 Bioquímico

As características bioquímicas, bem como o isolamento bacteriano, são importantes para a classificação da bactéria. Entretanto, as enzimas utilizadas nas reações bioquímicas podem ser produzidas em excesso ou de maneira limitada, variando dessa forma os resultados de algumas provas bioquímicas.

Gottschalk (2012) sugere o uso do teste de CAMP e o teste de atividade de urease para a identificação bioquímica de *A. pleuropneumoniae*.

A. pleuropneumoniae apresenta as seguintes reações metabólicas quando submetido ao crescimento junto a diferentes substratos: é positivo para hidrólise de esculina, urease, arabinose, lactose, maltose, melibiose, sacarose, trealose. Apresenta reação negativa para manitol e resultado variável para catalase, oxidase e para fator V ou NAD (QUINN et al., 2011).

Ao identificar, bioquimicamente, estirpes atípicas de *A. pleuropneumoniae*, urease negativas, recomenda-se a confirmação da identificação do agente por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) (GOTTSCALK, 2012).

2.6.3 Métodos moleculares

Diversas técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram desenvolvidas nas últimas três décadas. O primeiro método de PCR para a detecção de *A. pleuropneumoniae* foi desenvolvido por Sirois, Lemire, e Levesque (1991). A avaliação do método demonstrou maior sensibilidade comparada ao isolamento bacteriano (GRAM; AHRENS; NIELSEN, 1996). Os primeiros testes de PCR objetivavam amplificar sequências bem definidas do genoma de *A. pleuropneumoniae* de forma rápida e acessível. Um exemplo destes testes amplifica região codificadora de proteína externa de membrana (GRAM; AHRENS, 1998). Também foram desenvolvidos PCR baseados nos genes de toxinas Apx (RAYAMAJHI et al., 2005). Segundo Frey (1995) este método é utilizado para determinar quais genes da toxina Apx estão presentes em um determinado isolado de *A. pleuropneumoniae*, podendo, desta forma, identificar a virulência desta estirpe.

A fim de conhecer melhor o agente envolvido, inicialmente, foram descritos testes de PCR específicos para alguns sorotipos (JESSING; INZANA, 2003; HÜSSY et al., 2004; ANGÉN; AHRENS; JESSING, 2008). Além desses, foram desenvolvidos testes de PCR multiplex, para a identificação de grupos de sorotipos: 1, 7 e 12 (ANGÉN; AHRENS; JESSING, 2008); sorotipos 1, 5 e 7 (ITO, 2010); sorotipos 1, 2 e 8 (SCHUCHERT et al., 2004).

Ao considerar métodos de tipagem, a caracterização genotípica das estirpes, realizada após a identificação de espécie pela PCR, pode ser feita por meio de métodos que envolvem a amplificação de DNA ou de técnicas que implicam quebra do DNA bacteriano mediante presença de enzimas de restrição como a eletroforese em gel de campo pulsado - PFGE (CHEVALLIER et al., 1998).

Outra técnica descrita para *A. pleuropneumoniae* baseada na PCR é o polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados – AFLP, a qual Kokotovic e Angen (2007) descrevem o uso da técnica para descrição da variação genotípica de grupo de estirpes de *A. pleuropneumoniae*.

2.6.4 Resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos são amplamente empregados na suinocultura moderna, sendo de alta relevância, pois são utilizados em programas preventivos e terapêuticos.

Ao considerar programas terapêuticos para o tratamento da infecção por *A. pleuropneumoniae*, os mesmos devem ser definidos de acordo com o resultado da análise de resistência aos antimicrobianos disponíveis. No entanto, é necessário obter informações atualizadas, uma vez que padrões de resistência variam muito com o tempo e nas diferentes regiões geográficas (BARCELLOS et al., 2009). Recomenda-se que o primeiro antimicrobiano a ser escolhido deve apresentar o valor mais baixo de concentração inibitória mínima (CIM) (GOTTSCALK, 2012).

Diversas metodologias podem ser empregadas para determinar a resistência aos antimicrobianos, sendo a microdiluição em placa uma técnica moderna e de utilização prática. A técnica de disco-difusão há muitos anos é explorada; porém, esta é limitada por fornecer apenas dados qualitativos, enquanto que a determinação da concentração inibitória mínima proporciona dados quantitativos, como valores das concentrações de antimicrobianos que podem auxiliar na determinação da dosagem a ser utilizada ou ajustada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isoladas de suínos provenientes de diferentes estados brasileiros no período compreendido entre os anos de 2006 e 2013.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias da espécie *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir do trato respiratório de suínos provenientes de diferentes estados brasileiros.
- Reativar as estirpes com características morfológicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pertencentes às coleções de cultura do Laboratório de Sanidade Suína (FMVZ-USP) e do Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas (IPEVE-Belo Horizonte, MG).
- Realizar a identificação das estirpes pela PCR.
- Determinar os sorotipos das estirpes de *A. pleuropneumoniae* por meio da PCR.
- Determinar padrões genotípicos das estirpes de *A. pleuropneumoniae* por meio do AFLP e da PFGE.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos frente às estirpes de *A. pleuropneumoniae*.
- Comparar o grau de discriminação das técnicas de caracterização genotípicas e avaliar se existe relação entre os sorotipos detectados, perfis genotípicos, e perfis de resistência observados.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram analisadas 85 estirpes de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Dentre as estirpes avaliadas, 17 foram isoladas no presente estudo a partir do trato respiratório de suínos e 68 estirpes que apresentavam características morfológicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* foram provenientes de duas coleções de culturas: Laboratório de Sanidade Suína do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas (IPEVE), Belo Horizonte, MG.

As estirpes envolvidas neste estudo foram isoladas entre os anos de 2006 e 2013 de suínos dos seguintes estados brasileiros: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul.

Os fragmentos de pulmão avaliados eram provenientes de animais com histórico clínico de pneumonia segundo relatos anexados ao material a ser examinado. Os isolamentos foram obtidos com semeadura de tecido pulmonar em ágar sangue de carneiro (5%) com estria de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtor de NAD) incubados a 37°C por 24 horas em microaerofilia.

As estirpes selecionadas foram mantidas congeladas a -86°C em meio crioprotetor próprio para o agente que consiste em 2 gr de meio *Skim Milk - Difco*®, 3gr de caldo triptona de soja, 0,5 ml glicose e 10 ml de glicerina (STGG).

Para a reativação bacteriana, cada cultura foi semeada em dois meios de cultura: 4 ml de caldo BHI (*brain heart infusion*) enriquecido com NAD e 5% de soro fetal bovino e ágar sangue de carneiro (5%) com estria de *S. aureus*. Tubos e placas foram incubados em microaerofilia, durante 24 horas a 37°C.

Tanto na reativação quanto no isolamento bacteriano foi selecionada uma colônia isolada de *A. pleuropneumoniae* para a realização dos testes propostos. Esta, por sua vez, foi repicada em caldo e a partir deste cultivo foi separada uma alíquota de 1 ml, posteriormente, utilizada para extração de DNA.

O DNA bacteriano foi obtido pela extração fundamentada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do isotiocianato de guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA. Esta técnica de purificação de ácido nucleicos foi descrito por BOOM et al. (1990).

4.2 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

4.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A reação foi realizada com os seguintes passos: desnaturação à 95°C por 15 minutos seguido por 34 ciclos de 1 minuto à 95°C, 1 minuto à 55°C e 1 minuto e meio a 72°C.

4.2.1.1 Identificação

As estirpes selecionadas foram caracterizadas com os seguintes *primers* descritos por GRAM e AHRENS (1998).

Tabela 1 – Sequência dos primers empregados na identificação de *A. pleuropneumoniae*

Alvo	Primer	Sequencia (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>A. pleuropneumoniae</i>	LPF	AAGGTTGATATGTCCGCACC	950
	LPR	CACCGATTACGCCTTGCCA	

Fonte: GRAM e AHRENS (1998).

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 2 mM de MgCl₂, 30 pmoles de cada primer (Quadro 1), 200µM de cada dNTP, 1 unidade de Taq DNA polimerase, tampão da enzima 1X e água Milli-Q até 50 µl de volume final.

A detecção dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando o corante BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad®) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs®).

4.2.1.2 Sorotipagem molecular

A sorotipagem foi realizada por meio da PCR utilizando os *primers* descritos por BOSSE et al., (2014) e TURNI et al., (2014). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL de DNA, 2,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 20 pmoles de cada primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e H₂O MiliQ® até o volume final de 50 µL. Assim como na identificação da espécie bacteriana, a detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando corante BlueGreen® (LGC Biotecnologia). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad®) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

4.2.2 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*. A técnica consiste em três etapas:

1. Restrição do DNA bacteriano pela enzima *Hind III*

Em um microtubo contendo 10 µL do DNA bacteriano foram adicionados 24 U *Hind III*, 2 µL tampão da enzima *Hind III* e 5,6 µL de H₂O MilliQ®, perfazendo um

volume total de 20 µL. Esta reação foi incubada a 37°C *overnight*. A posição reativa ao sítio de restrição da enzima *Hind III* é apresentada no Quadro 1.

2. Ligação de adaptadores de ao DNA digerido

Em um novo microtubo foram adicionados 5 µL do DNA submetido a restrição, 4 µL tampão de T4 DNA-ligase, 0,2 µL de cada adaptador (ADH1/ADH2), 1 U T4 DNA ligase e H₂O MiliQ[®] para o volume final de 15 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Ao final deste período, o DNA ligado aos adaptadores foi aquecido a 80°C por 10 minutos para inativação da enzima T4 DNA ligase. As sequências dos adaptadores ADH1 e ADH2 estão descritas no Quadro 1.

3. Amplificação seletiva dos fragmentos de restrição

Os fragmentos de restrição foram submetidos a uma amplificação utilizando o iniciador HI-G (Quadro 1). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA ligado, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do iniciador (HI-G), 1 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e H₂O MiliQ[®] até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C.

Quadro 1 – Sítio de restrição da enzima *Hind III* e sequências de nucleotídeos dos adaptadores ADH1 e ADH2 e do iniciador HI-G

1. Sítio de restrição <i>Hind III</i>	5' AGCTT----//----A 3' 3' A----//----TTCGA 5'
2. Adaptadores	ADH 1 5' ACGGTATGCGACAG 3' ADH 2 3' GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5'
3. Iniciador	HI-G 5' GGTATGCGACAGAGCTTG 3'

Legenda: (1) Sítios de restrição da endonuclease *Hind III*; (2) sequência dos oligonucleotídeos complementares que serão os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição; (3) sequência do iniciador utilizado na amplificação dos fragmentos de restrição.

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 30 V durante 26 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).

4.2.3 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As estirpes foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad®). Em síntese, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 foi incorporada em agarose de baixo ponto de fusão (SeaKem® Gold) e, após homogeneização, transferida para moldes plásticos. Os plugs de agarose resultantes contendo a amostra foram então submetidos a um processo de lise in situ e, posteriormente, estocados em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do plug foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Apa* I e posteriormente adicionada ao gel de agarose SeaKem® Gold 1%. A eletroforese foi conduzida em período de 24 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 5 segundos e final de 20 segundos, em tampão TBE 0,5x (Tris-borato-EDTA 50 mM Tris, 45 mM Borato, 0,5 mM EDTA [pH 8.4]) mantido a 14°C.

O gel foi corado por 40 minutos no corante Syber Safe® (30 µL/300 mL) e a visualização dos fragmentos realizada sob iluminação ultravioleta em sistema de foto-documentação Gel Doc XR® (Bio Rad®). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences®).

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* para organismos fastidiosos (CLSI, 2013, 2015) utilizando-se painel BOPO6F Sensititre® (*TREK Diagnostic Systems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) ilustrado na Figura 1. A estirpe de *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090 foi utilizada como controle de qualidade conforme preconizado pelo CLSI (CLSI 2015). Os antimicrobianos testados foram os seguintes: ampicilina (AMP), clindamicina (CLI), clortetraciclina (CTET), danofloxacin (DANO), enrofloxacin (ENRO), florfenicol (FFN), gentamicina (GEN), neomicina (NEO), oxitetraciclina (OXY), penicilina (PEN), sulfadimetoxina (SDM), espectinomicina (SPE), trimetoprima/sulfametoxazole (SXT), tiamulina (TIA), tilmicosina (TIL), tulatromicina (TUL), tilosina (TYLT) e ceftiofur (TIO).

Figura 1 – Esquema de distribuição dos antimicrobianos no painel BOPO6F Sensititre® (*TREK Diagnostic Systems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*)

Plate Code: BOPO6F												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TIO 8	TIA 32	CTET 8	OXY 8	PEN 8	AMP 16	DANO 1	SXT 2/38	TYLT 4	TUL 4	CLI 16	SDM 256
B	TIO 4	TIA 16	CTET 4	OXY 4	PEN 4	AMP 8	DANO 0.5	SPE 64	TYLT 2	TUL 2	CLI 8	ENRO 2
C	TIO 2	TIA 8	CTET 2	OXY 2	PEN 2	AMP 4	DANO 0.25	SPE 32	TYLT 1	TUL 1	CLI 4	ENRO 1
D	TIO 1	TIA 4	CTET 1	OXY 1	PEN 1	AMP 2	DANO 0.12	SPE 16	TYLT 0.5	TIL 64	CLI 2	ENRO 0.5
E	TIO 0.5	TIA 2	CTET 0.5	OXY 0.5	PEN 0.5	AMP 1	NEO 32	SPE 8	TUL 64	TIL 32	CLI 1	ENRO 0.25
F	TIO 0.25	TIA 1	TIA 0.5	GEN 16	PEN 0.25	AMP 0.5	NEO 16	TYLT 32	TUL 32	TIL 16	CLI 0.5	ENRO 0.12
G	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	PEN 0.12	AMP 0.25	NEO 8	TYLT 16	TUL 16	TIL 8	CLI 0.25	POS
H	FFN 8	FFN 4	FFN 2	FFN 1	FFN 0.5	FFN 0.25	NEO 4	TYLT 8	TUL 8	TIL 4	POS	POS

ANTIMICROBICS	
TIO	Ceftiofur
TIA	Tiamulin
CTET	Chlortetracycline
GEN	Gentamicin
FFN	Florfenicol
OXY	Oxytetracycline
PEN	Penicillin
AMP	Ampicillin
DANO	Danofloxacin
SDM	Sulphadimethoxine
NEO	Neomycin
SXT	Trimethoprim / sulfamethoxazole
SPE	Spectinomycin
TYLT	Tylosin tartrate
TUL	Tulathromycin
TIL	Tilmicosin
CLI	Clindamycin
ENRO	Enrofloxacin
POS	Positive Control

O inóculo bacteriano utilizado no teste de microdiluição em caldo foi preparado a partir de cultivo puro de *A. pleuropneumoniae* em caldo BHI suplementado com soro fetal bovino e NAD incubado a 37°C por 18-24 horas. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9%. A concentração foi ajustada por meio do espectrofotômetro (Nanodrop - 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada continha aproximadamente 1×10^8 UFC/mL.

Uma vez ajustada, 50 µl da suspensão bacteriana foi diluída em 10 ml de caldo Mueller Hinton II (Difco-BBL[®], Detroit, Michigan, EUA) suplementado com soro fetal bovino e NAD de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Uma alíquota de 50 µl desta diluição foi distribuída em cada um dos 96 poços da microplaca, a mesma foi selada com adesivo e incubada a 37°C por 24 horas em microaerofilia.

O resultado do teste de microdiluição fornece a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe o crescimento bacteriano visível nos poços da microplaca. O crescimento é detectado pela visualização a olho nu de um “botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a consequente precipitação das células bacterianas ao fundo.

A análise dos resultados foi baseada nos pontos de corte descritos na Tabela 2, para a caracterização das estirpes como sensível, resistente e sensibilidade intermediária. CIM 50 e CIM 90 representam a concentração inibitória mínima que inibe o crescimento visível de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

Tabela 2 – Critério utilizados para a análise dos resultados da CIM (pontos de corte)

Agentes antimicrobianos	CIM (µl/ml)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	≤0,5	1	≥2
Ceftiofur	≤2	4	≥8
Clindamicina	≤0,5	1-2	≥4
Clortetraciclina	≤0,5	1	≥2
Danofloxacina	≤0,25	-	-
Enrofloxacina	≤0,25	-	≥1
Florfenicol	≤2	-	≥8
Gentamicina	≤2	4	≥8
Neomicina	≤8	-	-
Oxitetraciclina	≤0,5	1	≥2
Penicilina	≤0,25	0,5	1
Espectinomicina	≤32	-	≥128
Sulfadimetoxina	≤256	-	≥512
Tiamulina	≤16	-	≥32
Tilmicosin	≤16	-	≥32
Tulatromicina	≤64	-	-
Tilosina	≤1	2-4	>4
Trimetoprim/Sulfametoxazole	≤2/38	-	≥4/76

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferentes análises estão descritas abaixo.

4.4.1 Análise descritiva

A distribuição das frequências das estirpes segundo origem, ano de isolamento, sorotipo e resistência a antimicrobianos foi realizada com o programa SPSS 16.0 (SPSS Inc).

4.4.2 Análise dos fragmentos amplificados e análise de agrupamento da PFGE

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados (AFLP) foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). Um dendograma 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).

Para a análise de agrupamento dos perfis de macrorestrição foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). Um dendograma foi construído utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). A distinção de pulsotipos foi determinada a partir de quatro bandas de diferença entre as estirpes (VAN BELKUM et al., 2007).

5 RESULTADOS

Durante os anos de 2006 a 2013 foram isoladas 85 estirpes de *A. pleuropneumoniae* por meio de amostras recebidas no Laboratório de Sanidade Suína (VPS-FMVZ-USP) e no Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas (IPEVE). A distribuição das estirpes de acordo com o estado e ano de isolamento está descrita na Tabela 3.

Quanto ao sítio de isolamento, 84 estirpes foram isoladas de pulmão e apenas uma proveniente de pericárdio.

Tabela 3 – Frequência de estirpes por estado e ano de isolamento

Ano	GO	MG	MS	MT	PR	RS	SC	SP	Total
2006	-	2 (2,4%)	-	-	-	-	-	-	2 (2,4%)
2007	-	-	2 (2,4%)	1 (1,1%)	-	-	-	-	3 (3,5%)
2008	4 (4,7%)	2 (2,4%)	-	-	-	-	1 (1,1%)	-	7 (8,2%)
2009	-	3 (3,5%)	-	-	-	-	-	-	3 (3,5%)
2010	-	-	-	-	-	26 (30,6%)	-	-	26 (30,6%)
2011	1 (1,1%)	17 (20,2%)	9 (10,6%)	2 (2,4%)	1 (1,1%)	-	3 (3,5%)	1 (1,1%)	34 (40,0%)
2012	-	6 (7,1%)	-	2 (2,4%)	-	-	1 (1,1%)	-	9 (10,6%)
2013	-	1 (1,2%)	-	-	-	-	-	-	1 (1,2%)

5.1 IDENTIFICAÇÃO E SOROTIPAGEM MOLECULAR

Todas as 85 estirpes foram identificadas como *A. pleuropneumoniae* por meio da PCR.

Após confirmação de espécie pela técnica PCR, o DNA extraído de cada estirpe foi submetido a técnica de sorotipagem molecular. Para isso foi realizado PCR específico para os seguintes sorotipos: 5, 6, 7, 8 e 10. Dentre os sorotipos

Tabela 6 – Distribuição de sorotipos de *A. pleuropneumoniae* entre as estirpes estudadas por estado

Estado	Sorotipo						Total
	10	5	6	7	8	NT	
GO	2	-	1	-	-	2	5
	8,0%	-	33,3%	-	-	14,3%	5,9%
MG	13	2	-	5	5	6	31
	52,0%	6,1%	-	100,0%	100,0%	42,9%	36,5%
MS	7	1	1	-	-	2	11
	28,0%	3,0%	33,3%	-	-	14,3%	12,9%
MT	1	1	-	-	-	3	5
	4,0%	3,0%	-	-	-	21,4%	5,9%
PR	-	-	-	-	-	1	1
	-	-	-	-	-	7,1%	1,2%
RS	-	26	-	-	-	-	26
	-	78,8%	-	-	-	-	30,6%
SC	1	3	1	-	-	-	5
	4,0%	9,1%	33,3%	-	-	-	5,9%
SP	1	-	-	-	-	-	1
	4,0%	-	-	-	-	-	1,2%
Total	25	33	3	5	5	14	85
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Estirpes provenientes do estado de Minas Gerais foram as mais frequentes. Os sorotipos 7 e 8 apresentaram 100% de frequência neste estado. Em sequência, o sorotipo 10 representou 52% das estirpes oriundas de Minas Gerais. No estado de São Paulo o sorotipo 10 foi o único isolado no presente estudo. Em Goiás foram isolados os sorotipos 6 (33,3%) e 10 (8,0%). Em Mato Grosso os sorotipos 5 (3,0%) e 10 (4,0%) foram isolados e em Mato Grosso do Sul, 5 (3,0%), 10 (28,0%) e 6 (33,3%). A estirpe proveniente do estado do Paraná não foi tipável. Em Santa Catarina os sorotipos mais frequentes foram 6 (33,3%), 10 (4,0%) e 5 (9,1%). No estado do Rio Grande do Sul apenas estirpes de sorotipo 5 foram isoladas.

5.2 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Todas as 85 estirpes estudadas foram caracterizadas pelo AFLP sendo identificados 35 perfis (A1 – A35). A análise de agrupamento resultou no dendograma apresentado na Figura 2. Pode-se observar a distinção de dois grupos

principais com menos de 65% de similaridade genética: o menor é composto por 10 estirpes classificadas em oito perfis (A28 – A35) e correspondem às estirpes com genótipos mais distintos, enquanto que o grupo maior é composto pelas demais 75 estirpes sendo estas distribuídas em agrupamentos internos a partir de 70% de similaridade. Aparentemente, existe uma leve tendência de agrupar as cepas por origem e sorotipo, como observado nos perfis A4, A6, A20, A21 e A23, por exemplo; no entanto, também existem perfis de AFLP agrupando estirpes de origens distintas e sorotipo (A7, A9, A26). O índice discriminatório calculado para o AFLP foi de 0,97.

Figura 2 – Dendrograma obtido a partir da análise de estirpes de *A. pleuropneumoniae* por meio do AFLP com enzima de restrição *Hind III*

5.3 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Na análise da PFGE foram identificados 19 pulsotipos (P1 – P19) com mais de 55% de similaridade genética. No dendograma (Figura 3) pode-se observar a distinção de dois grupos principais: o menor é composto por sete estirpes classificadas em seis perfis (P14 – P19) e correspondem às estirpes com genótipos mais distintos e, em sua maioria, do sorotipo 7; o grupo maior é composto pelas demais 78 estirpes sendo estas distribuídas em 13 pulsotipos. Dentre estes, destaca-se o pulsotipo P1 que contém 30 estirpes originárias de quatro estados e de anos distintos sendo observado um predomínio do sorotipo 5. Apesar de existirem pulsotipos, como o P5 e P10, que agrupam estirpes de mesmo sorotipo mas origem distinta, não foi observada relação direta entre os perfis de PFGE com os dados de origem, sorotipo e perfil de resistência. O índice discriminatório calculado para o PFGE foi de 0,84.

Figura 3 – Dendrograma obtido a partir da análise de estirpes de *A. pleuropneumoniae* por meio da PFGE com enzima de restrição *ApaI*

5.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As 85 estirpes foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima envolvendo 18 antimicrobianos por meio da microdiluição em caldo. Os resultados obtidos, os pontos de corte, os valores da CIM 50, CIM 90 e as porcentagens de resistência são apresentados na Tabela 8 e Figura 4.

Considerando os pontos de corte, todas as 85 estirpes foram sensíveis ao ceftiofur, gentamicina, tulatromicina e tilmicosina. A maioria das estirpes apresentaram sensibilidade à tiamulina (80/85, 94,1%), trimetropima/sulfametoxazole (83/85, 97,6%), gentamicina (84/85, 98,8%), ampicilina (79/85, 92,9%), danofloxacin (73/85, 85,9%), florfenicol (84/85, 98,8%), neomicina (84/85, 98,8%), espectinomicina (84/85, 98,8%) e à enrofloxacin (74/85, 87,1%). Em relação à penicilina, a maioria apresentou valores de CIM abaixo de 0,5 µg/ml. Contudo, altas taxas de resistência foram observadas frente à clindamicina (77/85, 90,6%), clortetraciclina (57/85, 67,1%), oxitetraciclina (57/85, 67,1%) e à sulfadimetoxina (44/85, 51,8%). No entanto, a maior taxa de resistência foi observada frente à tilosina (84/85, 98,8%).

Adotando os critérios de multirresistência descritos por Schwarz et al. (2010) e Magiorakos et al. (2012), 55,2% das estirpes apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes.

Tabela 7 – Frequência de estirpes multirresistentes de acordo com os períodos avaliados.

Perfil de resistência	2006 - 2010	2011 - 2013
≤ 2 classes	14	24
3 - 4 classes	27	17
≥ 5 classes	-	3

Conforme apresentado na Tabela 7, dentre as 41 estirpes isoladas entre os anos de 2006 e 2010, 65,9% foram classificadas como multirresistentes. Já no intervalo de 2011 e 2013, 45,4% das estirpes apresentaram multirresistência; no entanto, foram isoladas neste período as estirpes de menor susceptibilidade apresentando resistência a mais de 5 classes de antimicrobianos.

Figura 4 – Dendrograma obtido a partir da análise de estirpes de *A. pleuropneumoniae* de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos

Tabela 8 – Distribuição dos valores de CIM obtidos dentre as 85 cepas avaliadas, valores de CIM 50, CIM 90 e frequência de cepas resistentes

Antimicrobiano	Nº de estirpes com CIM de (µg/mL)											CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Resistencia N (%)
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128			
Penicilina	3	24	36	16	0	1	0	5	0	0	0	0,5	1	24,7
Ampicilina	0	75	4	0	0	0	1	0	5	0	0	0,25	0,5	7,1
Ceftiofur	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25	0,0
Clortetraciclina	0	0	18	10	26	21	10	0	0	0	0	2	8	67,1
Oxitetraciclina	0	0	23	5	0	1	12	44	0	0	0	16	16	67,1
Danofloxacin	66	7	2	2	8	0	0	0	0	0	0	0,12	1	14,1
Enrofloxacin	67	6	4	0	0	8	0	0	0	0	0	0,12	0,5	12,9
Florfenicol	0	20	60	4	0	0	1	0	0	0	0	0,5	0,5	1,2
Espectinomycin	0	0	0	0	0	0	0	5	79	1	0	32	32	1,2
Gentamicin	0	0	23	2	59	1	0	0	0	0	0	2	2	0,0
Neomicin	0	0	0	0	0	76	8	1	0	0	0	4	8	1,2
Clindamicin	0	0	0	0	8	28	46	2	1	0	0	8	8	90,6
Tilosina	0	0	0	0	0	1	1	7	56	20	0	32	64	98,8
Tilmicosin	0	0	0	0	0	22	58	5	0	0	0	8	8	0,0
Tulatromycin	0	0	0	0	7	9	50	19	0	0	0	8	16	0,0
Tiamulina	0	0	0	0	1	0	11	68	5	0	0	16	16	5,9

6 DISCUSSÃO

O comportamento dos agentes bacterianos, assim como as características dos quadros clínicos conhecidos na suinocultura têm sofrido várias modificações nos últimos 30 anos. Este fato pode estar relacionado a vários acontecimentos relativamente recentes como a seleção genética; o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, o surgimento dos complexos de enfermidades e aos altos níveis de antimicrobianos utilizados na produção animal (SOBESTIANSKY et al., 2001). Neste contexto a pleuropneumonia suína está entre as doenças mais importantes que afetam a produção de suínos.

Diante desse cenário, a sorotipagem tornou-se importante, uma vez que a relevância do uso da técnica está na identificação dos isolados de *A. pleuropneumoniae* para levantamento epidemiológico de rebanho e da região onde o rebanho se insere. Com isso, monitora-se a presença de diferentes sorotipos, além de determinar escolha de bacterinas a serem utilizadas em estratégia preventiva. No entanto, a variabilidade antigênica entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* tem dificultado a produção de testes de diagnóstico específicos que incluam todos os sorotipos.

No presente estudo o sorotipo 5 foi o mais frequente, dado corroborado pelo estudo desenvolvido por Kuchiishi et al. (2007). Estes autores descrevem a caracterização de 399 estirpes de *A. pleuropneumoniae* isoladas em diferentes estados do Brasil entre 1993 e 2006, sendo que o sorotipo 5 ocorreu em 14,8% das estirpes seguido pelo 3 (13,8%), 10 (7,3%), 6 (6,5%) e 7 (5%). Um total de 171 isolados não foi tipável no referido estudo (42,8%).

Kuchiishi et al. (2007) ainda relatam que a ocorrência dos sorotipos 5 e 3 diminuiu entre os anos 2000 e 2006. Os autores relacionam a queda ao possível sucesso das vacinas no controle da pleuropneumonia causada por esses sorotipos. Essa mesma relação não pode ser considerada no presente estudo, uma vez que os isolamentos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5 aumentaram durante o período pesquisado, porém não foi identificado sorotipo 3, o que indica uma possível redução nas infecções por esse sorotipo.

A técnica de sorotipagem utilizada no estudo de Kuchiishi et al. (2007) foi a imunodifusão em gel de ágar. No presente estudo utilizou-se a PCR para esta

caracterização. A imunodifusão é uma técnica tradicional e bastante reconhecida, porém suas limitações envolvem: disponibilidade de estirpes de referência para a imunização de coelhos ou suínos que produzirão soros hiperimunes e reação cruzada entre os sorotipos 1, 9 e 11; 4 e 7; 3, 6 e 8, descrita por Zhou et al. (2008).

Estudos conduzidos no Canadá entre os anos 2011 e 2014 também revelaram uma maior frequência de estirpes do sorotipo 5 (GOTTSCALK; LACOUTURE, 2015). O'Neill et al. (2010) sugerem maior ocorrência de sorotipo 8 na Inglaterra e País de Gales entre os anos de 1995 e 2007. A princípio, as estirpes deste estudo foram identificadas como sorotipo 3 por meio da técnica de imunodifusão, no entanto, os autores suspeitaram da ocorrência de reações cruzadas entre os antissoros e refizeram a sorotipagem pela PCR identificando, então, maior prevalência de sorotipo 8.

A caracterização genotípica das estirpes estudadas pelo AFLP com a enzima de restrição *Hind III* revelou um grande número de perfis (35), que em alguns casos agruparam as estirpes de acordo com o sorotipo ou origem, o índice discriminatório observado foi de 0,97. O padrão de bandas observados não foi muito nítido em algumas estirpes, mas todas puderam ser caracterizadas. O uso do AFLP com esta enzima de restrição não foi identificado na literatura consultada. Kokotovic e Angen, (2007) descrevem o uso do AFLP com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BspDI* em estirpes de *A. pleuropneumoniae*. O uso de duas enzimas de restrição aumenta consideravelmente o número de bandas obtidas e geralmente exige a identificação das mesmas em sistemas automatizados. No referido estudo, os autores observaram um índice discriminatório de 0,96, no entanto, diferente do observado no presente estudo, em todas as estirpes testadas houve o agrupamento de acordo com os sorotipos identificados.

A análise das estirpes pela PFGE resultou em uma separação dos isolados em 19 perfis com maior relação dos grupamentos formados com os sorotipos e origem, no entanto, o índice discriminatório foi reduzido para 0,84. A análise de *A. pleuropneumoniae* pela PFGE é descrita por diversos autores. Chevallier et al. (1998) avaliaram 44 estirpes dos sorotipos 1 e 5 e observaram um perfeito agrupamento das estirpes de acordo com os sorotipos com a enzima *ApaI*, mesma utilizada no presente estudo. Yoo et al. (2014), avaliaram 102 estirpes de *A. pleuropneumoniae* de diferentes sorotipos e anos de isolamento e observaram uma

grande variabilidade entre os perfis obtidos sem grande correlação com sorotipo e ano de isolamento.

As estirpes avaliadas no presente estudo têm uma origem bastante variada, o que dificulta o agrupamento e formação de grupos clonais. Apesar destas características, as duas técnicas (AFLP e PFGE) podem ter grande utilidade na avaliação de estirpes de plantéis relacionados ou em surtos da infecção, o que não é a situação observada neste grupo amostral.

O tratamento e o controle das doenças respiratórias de suínos no Brasil são realizados pela administração terapêutica ou metafilática de antimicrobianos nas fases de creche, crescimento e terminação. Esses medicamentos são administrados principalmente na fase inicial da creche e através de 1 a 4 pulsos ou choques medicamentosos nas fases de crescimento e terminação. Com o objetivo de avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos das estirpes de *A. pleuropneumoniae*, no presente estudo, as estirpes foram submetidas a determinação da concentração inibitória mínima pela microdiluição em caldo

Os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) desenvolvidos para agentes bacterianos causadores de doença respiratória suína foram adotados para categorizar as estirpes como sensíveis ou resistentes para a interpretação de teste de suscetibilidade em microdiluição em caldo. Optou-se por utilizar as placas *Sensititre BOP06F* contendo concentrações pré-estabelecidas de antimicrobianos a fim de diminuir a probabilidade de erros na diluição dos fármacos e por ser um método moderno e prático para a leitura dos resultados. Além disso, a escolha por um método quantitativo permite estimar, *in vitro*, a concentração da dose efetiva contra a bactéria, *in vivo*.

Considerando os resultados de CIM obtidos no presente estudo, observou-se que o antimicrobiano ceftiofur demonstrou menores taxas de resistência contra *A. pleuropneumoniae*, sendo observada também alta sensibilidade à tulatromicina, cotrimoxazol e florfenicol. Este resultado corrobora os reportados por Ann et al. (2014) que descreveram perfil semelhante em estirpes australianas. A resistência à ampicilina, penicilina e tetraciclina, observada nas estirpes brasileiras, também foi evidenciada por esses autores.

Segundo Gutiérrez et al. (2006), amoxicilina, cefalosporinas, tilmicosina e florfenicol são os antimicrobianos mais indicados para o controle das pneumonias em suínos. O perfil de susceptibilidade a ampicilina, ceftiofur, florfenicol e tilmicosina

observado em mais de 98% das estirpes estudadas corrobora a indicação desses antimicrobianos para o controle da pleuropneumonia no país.

Ao analisar a resistência frente às tetraciclinas, apesar do percentual de resistência à clortetraciclina e oxitetraciclina ser o mesmo (67,1%), a CIM 50 para clortetraciclina foi de 2µg/ml e de 16µl/ml para oxitetraciclina. Gutiérrez et al. (2006) também descreveram alta resistência à tetraciclina (73,8%) em estirpes espanholas, com CIM 50 de 32µg/ml. Os autores atribuíram esses resultados ao uso excessivo, durante décadas, de doses subterapêuticas nas granjas de suínos. Também atribuem à presença de genes de resistência *tet(B)*, *tet(H)*, *tet(I)* e *tet(O)* associados a plasmídeos.

Resistência à sulfadimetoxina foi observada em 51,8% das estirpes estudadas, sendo que 97,6% destas foram sensíveis ao cotrimoxazol. Gutiérrez et al. (2006) descrevem baixa resistência à sulfonamidas com 16.6% de resistência em estirpes espanholas frente à sulfisoxazole.

No presente estudo, 98,8% das estirpes foram resistentes a tilosina, no entanto, frente aos outros macrolídeos testados como tilmicosina e tulatromicina, não foi identificada resistência. Em estudo desenvolvido na França foram identificados resultados semelhantes: 80% das estirpes foram resistentes à espiramicina, mas apenas 2% à tilmicosina (PYÖRÄLÄ et al., 2014).

As altas taxas de resistência à tilosina em nosso país podem estar relacionadas ao uso massivo da droga para o controle de ileíte em granjas de suínos desde o início da década de 1990. Já foram reportados altos índices de resistência a este ativo em estirpes de *Brachyspira spp.* (VYT; HOMMEZ, 2006; HIDALGO et al., 2011).

Pyörälä et al. (2014) descrevem que o mecanismo de resistência mais conhecido contra macrolídeos e lincosamidas é a alteração do sítio de ação mediada por mais de 36 diferentes metilases de rRNA, codificadas pelos genes *erm*. Os genes mais prevalentes são *erm(A)*, *erm(B)* and *erm(C)*, que já foram descritos em *A. pleuropneumoniae* (WASTESON et al., 1996) apesar de não serem detectados recentemente nas estirpes resistentes (DAYAO et al 2016).

No presente estudo, não foram pesquisados genes de resistência, porém sabe-se que há um amplo uso de antimicrobianos em sistemas de produção de suínos no país, o que promove a disseminação de genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos.

A partir dos padrões de resistência identificados foi possível agrupar as 85 estirpes em 38 perfis, sendo o perfil de resistência a penicilina, clortetraciclina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina, clindamicina, neomicina e tilosina o mais frequente em 22,3% (19/85).

A frequência de multirresistência em estirpes de *A. pleuropneumoniae* neste estudo (55,2%) foi superior ao descrito por Ann et al. (2014) que descrevem 9,1% (6/66) e de Gutiérrez et al. (2006) que descrevem 0,6% (1/229). Apesar de terem sido observados baixos níveis de resistência a diversos antimicrobianos como ceftiofur, tilmicosina, tulatromicina, florfenicol e espectinomicina a alta ocorrência de estirpes multirresistentes indica o aumento da pressão de seleção e a necessidade de maior atenção no uso de antimicrobianos em suínos, sob o risco de redução nas opções de drogas para uso terapêutico em casos de surtos da doença.

7 CONCLUSÕES

- A PCR possibilitou a identificação das estirpes e dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*;
- Os sorotipos mais frequentes no presente estudo foram 5 seguido pelo 10, 7, 8 e 6;
- Foi observada alta variabilidade genética dentre as estirpes estudadas tanto pelo AFLP quanto pela PFGE;
- A PFGE apresentou um padrão de bandas mais nítido na análise de estirpes de *A. pleuropneumoniae* e apesar do índice discriminatório inferior houve melhor correlação com os dados epidemiológicos;
- Os antimicrobianos ceftiofur, tilmicosina, tulatromicina, florfenicol e espectinomicina são os que apresentaram menores taxas de resistência e podem ser indicados para possíveis infecções por *A. pleuropneumoniae*; e
- A multirresistência a antimicrobianos está presente e apresentou uma alta frequência nos isolados brasileiros.

REFERÊNCIAS

- ANGEN, Ø.; AHRENS, P.; JESSING, S. G. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 312–318, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508001922>>. Acesso em: 19 jan. 2017.
- ANN, D.; DAYAO, E.; GIBSON, J. S.; BLACKALL, P. J.; TURNI, C. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 1–2, p. 232–235, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.014>>. Acesso em: 19 jan. 2017.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; MARQUES, B. M. F. P. P.; MORES, T. J.; COELHO, C. F.; BOROWSKI, S. M. Practical aspects on the use of antimicrobials in pig production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. Supl 1, p. s151–s155, 2009.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J. Bacterioses. In: BARCELLOS, D. E. S. N.; SOBESTIANSKY, J. (Ed.). **Doença dos Suínos**. Goiânia: Cânone, 2007.
- BLACKALL, P. J.; KLAASEN, H. L. B. M.; VAN DEN BOSCH, H.; KUHNERT, P.; FREY, J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 15. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 1–2, p. 47–52, 2002.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1 mar. 1990. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/long/28/3/495>>. Acesso em: 8 jun. 2015.
- BOSSÉ, J. T.; JANSON, H.; SHEEHAN, B. J.; BEDDEK, A. J.; RYCROFT, A. N.; SIMON KROLL, J.; LANGFORD, P. R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 2, p. 225–235, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457901015349>>. Acesso em: 3 jun. 2015.
- BOSSÉ, J. T.; LI, Y.; ANGEL, O.; WEINERT, L. A.; CHAUDHURI, R. R.; HOLDEN, M. T.; WILLIAMSON, S. M.; MASKELL, D. J.; TUCKER, A. W.; WREN, B. W.; RYCROFT, A. N.; LANGFORD, P. R. Multiplex PCR Assay for Unequivocal

Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2380–2385, 2014.

CHEVALLIER, B.; DUGOURD, D.; TARASIUK, K.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M.; FREY, J. Chromosome Sizes and Phylogenetic Relationships between Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 160, n. 2, p. 209–216, 15 mar. 1998. Disponível em: <<http://femsle.oxfordjournals.org/content/160/2/209.abstract>>. Acesso em: 5 nov. 2015.

CHIER, K.; DE WAELE, T.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary research**, v. 41, n. 5, p. 65, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2899255&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 mai. 2015.

CHO, W.-S.; JUNG, K.; KIM, J.; HA, Y.; CHAE, C. Expression of mRNA Encoding Interleukin (IL)-10, IL-12p35 and IL-12p40 in Lungs from Pigs Experimentally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 2, p. 111–122, fev. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:VERC.0000047488.05304.3e>>. Acesso em: 27 mai. 2015.

DAYAO, D. A. E.; GIBSON, J. S.; BLACKALL, P. J.; TURNI, C. Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 94, n. 7, p. 227–231, 2016.

DUBREUIL, J. D.; JACQUES, M.; MITTAL, K. R.; GOTTSCHALK, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. **Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 1, n. 2, p. 73–93, 2000.

FENWICK, B. W.; OSBURN, B. I.; OLANDER, H. J. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. **American journal of veterinary research**, v. 47, n. 7, p. 1433–41, jul. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3740612>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

FREY, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 257–261, jun. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X00889398>>. Acesso em:

1 jun. 2015.

FREY, J. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 216, p. 87–95, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512357>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

GOTTSCHALK, M. Actinobacillosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Ed.). **Diseases of Swine**. 10th. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2012. p. 653–669.

GOTTSCHALK, M.; BROES, A.; FITTIPALDI, N. Recent developments on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: 34th Annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians, Orlando. **Anais...** Orlando: Proceedings of the 34th Annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians, 2003.

GOTTSCHALK, M.; LACOUTURE, S. Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. **The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne**, v. 56, n. 10, p. 1093–4, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483588>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

GRAM, T.; AHRENS, P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 2, p. 443–8, fev. 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 jun. 2015.

GRAM, T.; AHRENS, P.; NIELSEN, J. P. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. **Veterinary microbiology**, v. 51, n. 1–2, p. 95–104, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828126>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

GUTIÉRREZ, C. B.; GARCÍA DEL BLANCO, N.; BLANCO, M.; NAVAS MÉNDEZ, J.; RODRÍGUEZ FERRI, E. F. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 218–222, 2006.

HAESEBROUCK, F.; CHIERS, K.; VAN OVERBEKE, I.; DUCATELLE, R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. **Veterinary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 239–249, 1997.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3–4, p. 255–268, 2004.

HIDALGO, Á.; CARVAJAL, A.; VESTER, B.; PRINGLE, M.; NAHARRO, G.; RUBIO, P. Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3330–7, 1 jul. 2011. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/55/7/3330.abstract>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

HÜSSY, D.; SCHLATTER, Y.; MISEREZ, R.; INZANA, T.; FREY, J. PCR-based identification of serotype 2 isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovars I and II. **Veterinary Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 307–310, 2004.

ITO, H. Development of a *cps* -Based Multiplex PCR for Typing of *Actinobacillus*. **Journal Veterinarian Medical Science**, v. 72, n. 5, p. 653–655, 2010.

JANSEN, R.; BRIAIRE, J.; KAMP, E. M.; GIELKENS, A. L. J.; SMITS, M. A. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 126, n. 2, 1995.

JESSING, S. G.; INZANA, T. J. Evaluation of a Multiplex PCR Test for Simultaneous Identification and Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Evaluation of a Multiplex PCR Test for Simultaneous Identification and Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4095–4100, 2003.

KILIAN, M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. **Journal of general microbiology**, v. 93, n. 1, p. 9–62, 1976.

KOKOTOVIC, B.; ANGEN, Ø. Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3921–9, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 out. 2015.

KRISTENSEN, C. S.; ANGEN; ANDREASEN, M.; TAKAI, H.; NIELSEN, J. P.; JORSAL, S. E. Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located at close range. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 3–4, p. 243–249, 2004.

KUCHIISHI, S. S.; KICH, J. D.; LÚCIA, M.; RAMENZONI, F.; KLEIN, C. S.; BERNARDETE, M.; FÁVERO, B.; PIFFER, I. A. Sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados no Brasil de 1993 a 2006. **Acta scientiae veterinariae**, v. 35, n. October 2006, p. 79–82, 2007.

LIGGETT, A. D.; HARRISON, L. R.; FARRELL, R. L. Sequential study of lesion development in experimental *Haemophilus pleuropneumonia*. **Research in veterinary science**, v. 42, n. 2, p. 204–12, mar. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3589167>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

MACLNNES, J. I.; DESROSIERS, R. Agents of the “Suis-ide Diseases” of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 83–89, 1999.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 21–28, 2000.

NICOLET, J.; KÖNIG, H. On *haemophilus-pleuropneumonia* in swine. Bacteriologic, patho-anatomic and histological findings. Preliminary report. **Pathologia et Microbiologia**, v. 29, n. 3, p. 301–6, jan. 1966. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5924730>>. Acesso em: 3 jun. 2015.

O'NEILL, C.; JONES, S. C. P.; BOSSÉ, J. T.; WATSON, C. M.; WILLIAMSON, S. M.; RYCROFT, a N.; KROLL, J. S.; HARTLEY, H. M.; LANGFORD, P. R. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars in England and Wales. **The Veterinary record**, v. 167, p. 661–2, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257468>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

PEREIRA, M. F.; ROSSI, C. C.; VIEIRA DE QUEIROZ, M.; MARTINS, G. F.; ISAAC, C.; BOSSE, J. T.; LI, Y.; WREN, B. W.; TERRA, V. S.; CUCCUI, J.; LANGFORD, P. R.; BAZZOLLI, D. M. S. Galleria mellonella is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161, p. 387–400, 2015.

Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.083923-0>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

POHL, S.; BERTSCHINGER, H.; FREDERIKSEN, W.; MANNHEIM, W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haernolytica*-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 3, p. 510–514, 1983.

PYÖRÄLÄ, S.; BAPTISTE, K. E.; CATRY, B.; VAN DUIJKEREN, E.; GREKO, C.; MORENO, M. A.; POMBA, M. C. M. F.; RANTALA, M.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E. J.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEKE, K. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 230–239, 2014.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Actinobacillus species**. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2011.

RAYAMAJHI, N.; SHIN, S. J.; KANG, S. G.; LEE, D. Y.; AHN, J. M.; YOO, H. S. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 4, p. 359–62, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16130995>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

ROSENDAL, S.; BOYD, D. A.; GILBRIDE, K. A. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 68–74, 1985.

SCHALLER, A.; KUHN, R.; KUHNERT, P.; NICOLET, J.; ANDERSON, T. J.; MACINNES, J. I.; SEGERS, R. P. a M.; FREY, J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbiology**, v. 145, n. 8, p. 2105–2116, 1999.

SCHUCHERT, J. A.; INZANA, T.; ANGEN, Ø.; JESSING, S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4344–4348, 2004. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/42/9/4344.short>>. Acesso em: 19 jul. 2016.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601–604, 2010.

SHOPE, R. E. PORCINE CONTAGIOUS PLEUROPNEUMONIA: I. EXPERIMENTAL TRANSMISSION, ETIOLOGY, AND PATHOLOGY. **Journal of Experimental Medicine**, v. 119, n. 3, p. 357–368, 1 mar. 1964. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/119/3/357>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

SIROIS, M.; LEMIRE, E. G.; LEVESQUE, R. C. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1183–7, jun. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1864937>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

SOBESTIANSKY, J.; COSTA, O. A. D.; MORÉS, N.; BARIONI, W. J.; PIFFER, I. A.; GUZZO, R. **Estudos Ecopatológicos Das Doenças Respiratórias Dos Suínos: Prevalência E Impacto Econômico Em Sistemas De Produção Dos Estados De Santa Catarina, Rio Grande Do Sul E Paraná**. Concórdia: Embrapa, 2001. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot287.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2013.

TOBIAS, T. J.; BOUMA, A.; VAN DEN BROEK, J.; VAN NES, A.; DAEMEN, A. J. J. M.; WAGENAAR, J. A.; STEGEMAN, J. A.; KLINKENBERG, D. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* among weaned piglets on endemically infected farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 1, 2014.

TURNI, C.; SINGH, R.; SCHEMBRI, M. A.; BLACKALL, P. J. Evaluation of a multiplex PCR to identify and serotype *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 5, 7, 12 and 15. **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 4, p. 362–9, out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863421>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E.; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M.; EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ESCMID) STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13 Suppl 3, p. 1–46, out. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1463192X>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

VENGUST, G.; VALENCAK, Z.; BIDOVEC, A. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 53, n. 1, p. 24–7, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460352>>. Acesso em: 27 maio. 2015.

VYT, P.; HOMMEZ, J. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates compared with the clinical effect of treatment. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 75, n. 4, 2006.

WASTESON, Y.; ROE, D. E.; FALK, K.; ROBERTS, M. C. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary microbiology**, v. 48, n. 1–2, p. 41–50, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8701576>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

YOO, a N.; CHA, S. B.; SHIN, M.-K. K.; WON, H. K.; KIM, E. H.; CHOI, H. W.; YOO, H. S. Serotypes and antimicrobial resistance patterns of the recent Korean *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. **The Veterinary record**, 2014. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/174/9/223.full.pdf+html>>. Acesso em: 03 abr. 2016.

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; DE BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443–453, 2016.

ZHOU, L.; JONES, S. C. P.; ANGEN, Ø.; BOSSÉ, J. T.; NASH, J. H. E.; FREY, J.; ZHOU, R.; CHEN, H. C.; KROLL, J. S.; RYCROFT, a N.; LANGFORD, P. R. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross- reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 800–803, 2008.