

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA TILDIPROSINA CONTRA CEPAS CLÍNICAS DE  
*Haemophilus parasuis***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Priscila Rodrigues Peres**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2018**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA TILDIPIROSINA CONTRA CEPAS CLÍNICAS DE  
*Haemophilus parasuis***

**Priscila Rodrigues Peres**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF) como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Frandoloso**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2018**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE *IN VITRO* DA TILDIPIROSINA CONTRA CEPAS CLÍNICAS DE  
*Haemophilus parasuis***

Elaborada por  
**Priscila Rodrigues Peres**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioexperimentação**

**Comissão Examinadora**

**Rafael Frandoloso, Dr., UPF  
(Orientador/Presidente)**

**Luiz Carlos Kreutz, Dr., UPF**

**Marcelo Weiss, Dr., IMED**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2018**

CIP – Catalogação na Publicação

---

P437a Peres, Priscila Rodrigues

Atividade *in vitro* da tildipirosina contra cepas clínicas de *Haemophilus parasuis* / Priscila Rodrigues Peres. – 2018.

64 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Frandoloso.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Suíno – Doenças. 2. *Haemophilus parasuis*.  
3. Antimicrobianos. 4. Antibióticos em veterinária – Controle. I. Frandoloso, Rafael, orientador. II. Título.

CDU: 636.4.09

---

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

Captura

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais,

**Pedro dos Santos Peres**  
**Rosa Helena Moreira Rodrigues Peres**

Meu companheiro,

**Thiago Fogaça**

Para que ao lerem seus nomes nesta obra, sintam o amor e admiração que lhes tenho. Serei eternamente grata pelo apoio e compreensão que foram essenciais neste período.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos e me impulsionando na fé de dias melhores.

Aos meus queridos pais, Pedro dos Santos Peres e Rosa Helena Moreira Rodrigues Peres por se fazerem presentes na minha vida mesmo com tantos quilômetros de distância, e por não medirem esforços para me auxiliar na busca dos meus sonhos desde a conclusão da graduação até os dias de hoje.

Minha querida mãe, obrigada por me mostrar o significado da palavra coragem, pois o choro pode durar uma noite, mas a alegria vem sempre pela manhã quando o sol nasce e nos impulsiona para mais um dia de agradecimento e superação.

Meu pai, meu exemplo, aquele em que me espelho diariamente e recordo seus ensinamentos “A Bela e a Fera”. Obrigada por me ensinar a ver o futuro como uma estrela brilhante a guiar os meus passos no caminho de sorrisos e felicidades e por estar sempre ao meu lado nesta caminhada.

Aos meus irmãos por acompanharem cada passo deste aprendizado e vibrarem comigo os resultados.

Ao meu amor, Thiago Fogaça que esteve comigo nos altos e baixos e acompanhou as minhas correrias, ao meu lado até nos domingos de folga que viraram domingos de estudos. Sei que não deve ter sido fácil o meu mau humor, mas tua paciência e teu amor me fez chegar até aqui e juntos seguimos na batalha porque temos o principal: o amor e admiração um pelo outro.

A minha gestora farmacêutica, Daniele Dall Agnol, colega e amiga, com a qual convivo todos os dias e aprendo muito com seus conselhos e palavras de incentivo.

Ao meu orientador, professor Rafael Frandoloso, por ter dividido os seus conhecimentos comigo e por me propor um trabalho voltado para o que eu mais amo que é a farmacologia e a microbiologia. Obrigada, por me despertar o amor pela docência com suas maravilhosas aulas.

Aos professores e pesquisadores do Programa de Bioexperimentação, o meu agradecimento pelo conhecimento adquirido.

Ao professor, Luiz Carlos Kreutz pelas suas magníficas aulas de virologia.

Aos meus amigos, gratidão por torcerem por mim e compreenderem a minha ausência neste período.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada e do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação por todo o suporte durante o mestrado. Especial, as amigadas conquistadas, juntas desde o começo até o final: Ana Paula Voloski, Caroline Hermes e Simone Prigol.

A Universidade de Passo Fundo pela concessão da bolsa que me permitiu realizar este sonho.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meu singelo agradecimento.

## **EPIGRAFE**

“A persistência é o menor caminho do êxito”

*Charles Chaplin*

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1 A INFECÇÃO CAUSADA POR <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i> EM SUÍNOS.....	16
2.1.1 Histórico e importância no Brasil.....	16
2.1.2 Etiologia.....	17
2.1.3 Epidemiologia no Brasil.....	18
2.1.4 Patogenia e fatores de virulência.....	19
2.1.5 Sinais clínicos.....	21
2.1.6 Lesões macroscópicas e microscópicas.....	21
2.1.7 Diagnóstico.....	22
2.1.8 Tratamento e prevenção.....	22
2.2 <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i> E ANTIMICROBIANOS.....	23
2.2.1 Uso de antimicrobianos na suinocultura.....	23
2.2.2 Uso de antimicrobianos no tratamento da doença de Glässer.....	24
2.2.3 Relação entre o uso de antimicrobianos e ocorrência de resistência.....	30
2.2.4 Impacto da resistência na cadeia produtiva e saúde pública.....	31
2.2.5 Impacto do uso de antimicrobianos no meio ambiente.....	32
2.2.6 Aspectos regulatórios envolvendo o uso de antimicrobianos em animais.....	34
2.3 <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i> E ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS.....	35
2.3.1 Antimicrobianos macrolídeos.....	35
2.3.2 Mecanismo de resistência aos macrolídeos.....	36
2.3.3 Tildipirosina.....	37
2.3.4 Propriedades farmacodinâmicas.....	38
2.3.5 Propriedades farmacocinéticas.....	40
2.3.6 <i>Haemophilus parasuis</i> versus tildipirosina.....	41
<b>3. CAPÍTULO 1.....</b>	<b>43</b>
RESUMO.....	44
TEXTOS PRINCIPAL.....	45
CONFLITO DE INTERESSE.....	49



<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

**LISTA DE FIGURAS****2. REVISÃO DA LITERATURA**

**Figura 1.** Estrutura do composto macrolídeo natural tilosina (a direita) e o seu composto semissintético tildipirosina (a esquerda). ..... 38

**Figura 2.** Estrutura molecular da tildipirosina (C<sub>41</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>). ..... 39

**3. CAPÍTULO 1**

**Figura 1.** Distribuição da CMIs de Tildipirosina para 100 isolados clínicos de *H. parasuis*. ..... 53

## LISTA DE TABELAS

### 2. REVISÃO DA LITERATURA

**Tabela 1.** Dados de produção e exportação de suínos no Brasil nos anos de 2014 a 2016. .... 17

**Tabela 2.** Resumo dos resultados de 10 diferentes estudos sobre perfil de susceptibilidade ou resistência de isolados clínicos de *H. parasuis* a moléculas antimicrobianas. .... 25

**Tabela 3.** Perfil de expressão gênica relacionada a regulação positiva de genes de *H. parasuis* relacionados a resistência a tildipirosina..... 41

### 3. CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) de Tildipirosina sobre cepas clínicas de *H. parasuis* isoladas de sítios sistêmicos e de origem pulmonar. CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram definidos como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% das cepas clínicas, respectivamente. .... 52

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMR	Resistência antimicrobiana
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV	Antimicrobiano veterinário
CAC	Comissão Codex Alimentares
CLb	Depuração sistêmica total relativa
C <sub>máx</sub>	Concentração máxima
DG	Doença de Glässer
DSR	Doença respiratória suína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
I	Intermediário
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
HI	Hemaglutinação indireta
HIm	Hemaglutinação indireta modificada
<i>Hps, H. parasuis</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
KRG	Kielstein– Rapp-Gabrielson
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIC	Concentração inibitória mínima
MRL	<i>Maximun Residue Limit</i>
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NS	Não-sorotipificável
OMS	Organização Mundial de Saúde
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PK/PD	farmacocinética/farmacodinâmica
PCRm	Reação em cadeia da polimerase multiplex
PELF	Fluido de revestimento epitelial pulmonar
PM	<i>Pateurella multocida</i>
PPLO	<i>(pleuropneumonia like-organism)</i>
R	Resistente
S	Sensível
SV	Sorovar
UPF	Universidade de Passo Fundo
UFC	unidades formadoras de colônias
TIP	Tildipirosina
16S	Sub-unidade 30 do ribossoma
30S	Sub-unidade 50 do ribossoma

## RESUMO

**Dissertação de Mestrado**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação**  
**Universidade de Passo Fundo**

### **ATIVIDADE *IN VITRO* DA TILDIPÍROSINA CONTRA CEPAS CLÍNICAS DE *Haemophilus parasuis***

Autor: Priscila Rodrigues Peres  
Orientador: Rafael Frandoloso  
Passo Fundo, 31 de julho de 2018

A cadeia produtiva de carne suína é uma das mais importantes no Brasil e progressivamente vem se desenvolvendo, atualizando e se destacando em nível mundial. Entre os desafios sanitários de maior importância para a suinocultura industrial destacam-se as doenças respiratórias, as quais são altamente transmissíveis dentro de uma unidade de produção. Entre os patógenos relacionados com o complexo respiratório suíno, o *Haemophilus parasuis* (*Hps*) emerge como um dos principais, acometendo especialmente leitões nas fases de creche e gerando importantes perdas econômicas para a indústria. A vacinação destaca-se como a principal forma de prevenção da doença, porém as atuais vacinas comerciais não garantem imunidade cruzada protetora em razão da alta variabilidade fenotípica das cepas clínicas. Conseqüentemente, falhas de proteção ocorrem especialmente quando a granja está infectada com um sorovar diferente daquele contido na vacina. Assim, torna-se indispensável o uso de antimicrobianos para tratar os animais doentes, como também o monitoramento periódico dos antibióticos utilizados com este propósito, em razão do contínuo aparecimento de cepas resistentes, o que dificulta prever a eficácia de qualquer molécula sem uma avaliação prévia. A tildipirosina é um macrolídeo de última geração que começou a ser utilizada recentemente em suínos no Brasil, e sua estrutura química visa dificultar a emergência de resistência bacteriana. Em razão da importância da contínua avaliação de antibióticos contra bactérias de interesse na suinocultura, nesta dissertação, avaliamos o perfil de susceptibilidade de 100 cepas clínicas de *H. parasuis* a tildipirosina. Todas as cepas foram isoladas de suínos com doença de Glässer, sendo 58 procedentes de sítios sistêmicos (articulação, peritônio, pericárdio e cérebro) e 42 recuperadas do tecido pulmonar. Cada cepa representa um caso clínico individual de GD. O teste de susceptibilidade à tildipirosina foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, avaliando-se a concentração inibitória mínima (MIC) do produto (0.03 – 256 µg/ml). Nossos resultados demonstram que em geral as cepas clínicas de *H. parasuis* apresentam sensibilidade a tildipirosina, com MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de 0.25 e 32 µg/ml, respectivamente. Na análise de susceptibilidade em relação ao sítio de isolamento da amostra, observamos que as cepas de origem sistêmica apresentaram CMI<sub>50</sub> (0.25 µg/ml) superiores as observadas nas cepas de origem pulmonar (0.12 µg/ml). Levando em consideração a concentração tecidual máxima da tildipirosina a partir da administração em suínos da dose terapêutica (4 mg/kg) do produto comercial Zuprevo® (MSD, Brasil), 72% das cepas poderiam ser eficientemente combatidas. Um pequeno ajuste de dose, a partir das MICs encontradas, poderia aumentar a amplitude de eficácia do produto. No entanto, não seria suficiente para combater 8% cepas, as quais demonstraram-se altamente resistentes ao antibiótico. Em síntese, nossos resultados indicam que tildipirosina pode ser recomendada para o tratamento clínico de suínos com doença de Glässer, no entanto, em razão da presença de cepas já resistentes ao antibiótico, o teste de MIC deve ser periodicamente utilizado para (i) determinar a dose terapêutica e (ii) monitorar a evolução de resistência de *H. parasuis* a tildipirosina.

**Palavras-chave:** *Haemophilus parasuis*, doença de Glässer, tildipirosina, MIC.

**ABSTRACT**

**Master's Dissertation**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação**  
**Universidade de Passo Fundo**

***IN VITRO* ACTIVITY OF TILDIPIROSINA AGAINST CLINICAL STRAIN OF  
*HAEMOPHILUS PARASUIS***

Author: Priscila Rodrigues Peres

Advisor: Rafael Frandoloso

Passo Fundo, 31 de Julho de 2018

The pork production chain is one of the most important sectors in Brazil and it is continuously in progress in order to get high development, updating and global recognition. The respiratory diseases of swine are considered a high animal health challenge for industrial pig farms since they can be highly transmissible within a production unit. Amongst the pathogens related to the swine respiratory complex, *Haemophilus parasuis* has emerged as one of the most important and it affects piglets mainly in the nursery phases producing important economic losses for the industry. Vaccination stands out as the main form of prevent Glässer's disease (GD), but the current commercial vaccines do not guarantee protective cross-immunity due to the high phenotypic variability of the clinical strains of *H. parasuis*. Consequently, protection failures occur especially when the farm is infected with a serovar different from those contained in the vaccine. Thus, the use of antimicrobials to treat diseased animals is essential, as is the surveillance of the susceptibility profile of the antibiotics used for this purpose, due to the continuous appearance of resistant strains, which makes it difficult to predict the efficacy of any molecule without prior evaluation. Tildipirosin is a last generation macrolide that has been recently used in pigs in Brazil, and its chemical structure is aimed at hindering the emergence of bacterial resistance. Due to the importance of continuous evaluation of antibiotics against bacteria able to trigger diseases in pigs, here, we have evaluated the susceptibility profile of 100 clinical strains of *H. parasuis* to tildipirosin. All strains included in this study were isolated from pigs with Glässer's disease. From the total, 58 strains were isolated from systemic sites (joints, peritoneum, pericardium and brain) and 42 were recovered from lung tissue. Each strain represents an individual clinical case of GD. The tildipirosin susceptibility test was carried out using the broth microdilution technique, evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) of the product (0.03 - 256 µg / ml). Our results demonstrate that in general the clinical strains of *H. parasuis* are susceptible to tildipirosin, with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of 0.25 and 32 µg / ml, respectively. The tildipirosin susceptibility analysis relative to the sample isolation site showed that the strains from systemic sites presented a MIC<sub>50</sub> (0.25 µg/ml) higher than those observed in strains of pulmonary origin (0.12 µg/ml). Taking into account the maximum tissue concentration of tildipirosin after parenteral administration of the therapeutic dose (4 mg / kg) of the commercial product Zuprevo® (MSD, Brazil), 72% of the strains could be potentially affected. A small dose adjustment taking into consideration the MICs values could increase the breadth of the efficacy of the product. However, it would not be sufficient to treat 8% of the strains, which have been shown to be highly resistant to the tildipirosin. In summary, our results indicate that tildipirosin may be recommended for the clinical treatment of pigs suffering Glässer's disease, however, because of the presence of strains already resistant to the antibiotic, the MIC test should be periodically used to (i) determine the therapeutic dose and (ii) monitoring the *H. parasuis* susceptibility profile to tildipirosin.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*, Glässer's disease, tildipirosin, CMI.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Glässer (DG) é uma enfermidade infectocontagiosa provocada pelo *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), uma bactéria Gram negativa pertencente da família *Pasteurellaceae*. A DG afeta principalmente suínos jovens criados em sistemas intensivos de produção e, as perdas econômicas desta patologia, posicionam a DG entre as principais doenças que acometem leitões na fase de creche (1).

O *H. parasuis* é uma bactéria imóvel, as suas colônias são pequenas, translúcidas e não hemolíticas, morfológicamente apresenta-se como um simples bastonete a longas e filamentosas cadeias, sendo comumente encontrada na cavidade nasal de suínos saudáveis (2).

A prevenção da DG é feita por meio do uso de vacinas, no entanto, surtos da doença mesmo em granjas vacinadas são frequentes e demandam o uso de antimicrobianos. Em paralelo, programas preventivos baseados na administração de antimicrobianos na água de beber ou mesmo na ração, em diferentes momentos da produção do suíno (especialmente na fase de creche, crescimento/terminação), são uma realidade no Brasil (3) e despertam preocupação em razão do alto risco de inclusão de resistências antimicrobianas à patógenos veterinários e humanos. Em razão deste risco, diferentes países da União Europeia baniram o uso de antimicrobianos na prevenção de doenças de suínos há mais de 18 anos (4) e, de forma mais recente, os Estados Unidos da América passaram a restringir o uso de 8 classes de antimicrobianos, dentre estes: aminoglicosídeos, cefalosporinas, lincosaminas, macrolídeos, penicilinas, estreptograminas, sulfonamidas e tetraciclinas como produtoras de crescimento animal (5)

A preocupação com o uso de antimicrobianos é tamanha que a Organização Mundial da Saúde lançou um comunicado destacando a resistência aos antimicrobianos como uma importante ameaça à saúde pública global (6). Na mesma linha, um estudo prospectivo destaca que se medidas regulatórias em relação ao uso de antimicrobianos não forem instituídas de imediata o mundo assistirá a morte de ~ 10 milhões de humanos por ano em 2050 (4).

O uso extensivo e descontrolado de antimicrobianos está aumentando a resistência de importantes bactérias que acometem o trato respiratório dos suínos, assim como o risco de transmissão dos genes responsáveis pela resistência para microbiota dos seres humanos (7).

Atualmente, as moléculas antimicrobianas utilizadas para prevenção e tratamento de *H. parasuis* estão perdendo a sua eficácia clínica, esgotando-se o arsenal terapêutico disponível, resultados de estudo indicam que as cepas clínicas de *H. parasuis* apresentam alta resistência a gentamicina, bacitracina, lincomicina e tiamulina (8).

Portanto, é vital que se garanta a eficácia contínua de compostos criticamente importantes no tratamento de doenças tanto na área humana como também animal, já que humanos e animais constituem reservatórios sobrepostos de resistência e uma abordagem integrada, que leva isso em conta é, de fato, necessário.

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana ao ser determinado antes do tratamento, de acordo com as diretrizes que encorajam o uso racional de antimicrobianos (9,10) avalia a correta susceptibilidade bacteriana a antimicrobianos e garante uma terapia empírica ou dirigida adequada. Além de apoiar os profissionais de saúde na escolha do antimicrobiano mais adequado, visto que a persistência de ações erradas pode evoluir para a escassez terapêutica (9).

E, entre as técnicas disponíveis para proceder esta avaliação, a Microdiluição em caldo (MIC) é a mais recomendável, pois permite ao médico veterinário avaliar a evolução da eficácia da droga dentro da granja. Em outras palavras, ele pode verificar se a concentração mínima inibitória aumentou ou não ao longo do tempo. Esta abordagem deve assegurar que apenas o antimicrobiano que exibe susceptibilidade *in vitro* contra a bactéria seja utilizado e, portanto, provavelmente resultará em um sucesso terapêutico (11,12).

A tildipirosina (TIP) é um novo macrolídeo que começou a ser utilizada em 2015 no Brasil para tratamento e metafilaxia da doença respiratória suína (DRS) associada a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* e *Haemophilus parasuis* (13). A TIP é um análogo semi-sintético da tilosina e apresenta uma estrutura química única com capacidade de iludir os mecanismos de resistência bacteriana e aumentar a eficácia terapêutica (13).

No presente trabalho, avaliou-se pela primeira vez no Brasil o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas clínicas de *H. parasuis* provenientes de suínos com sintomas da DG frente a molécula Tildipirosina. Os resultados deste estudo, assim como o delineamento experimental estão descritos no capítulo 1 desta dissertação, em forma de um artigo científico, cujo o título é “Atividade *in vitro* de Tildipirosina em isolados clínicos de *Haemophilus parasuis*”.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A INFECÇÃO CAUSADA POR *Haemophilus parasuis* EM SUÍNOS

#### 2.1.1 Histórico e importância no Brasil

Em 1906, Karl Glässer, um médico veterinário alemão, descreveu um processo patológico que ocorria em leitões jovens e que cursava clinicamente com quadros de poliserosites e artrites (Sotheland and Simmons, 1947). Anos mais tarde, este processo foi denominado de doença de Glässer, o qual é causada por um pequeno bacilo Gram negativo denominado *Haemophilus parasuis*.

Da mesma forma que ocorreu com outros patógenos veterinários, inicialmente este microrganismo recebeu outras denominações. Em 1943, o agente foi denominado *Haemophilus suis* devido a necessidade dos fatores V (nicotinamida adenina nucleotídeo, NAD) e X (hemina ou outra porfirina) da coagulação sanguínea para crescimento *in vitro*. E, em 1960, sofreu modificação de nomenclatura para *Haemophilus influenzae suis*. Posteriormente, Biberstein and White (1969) (Little, 1970) por meio de análises bioquímicas verificaram que este agente não requeria o fator X para o crescimento, sendo conhecido atualmente como *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) (14,15).

Atualmente, a DG é considerada enzoótica, estando entre as doenças respiratórias de maior importância em rebanhos com elevado padrão sanitário, sendo comum o isolamento de *H. parasuis* na grande maioria das granjas tecnificadas de produção de suínos no Brasil (2). A DG vem se destacando devido à perda de produtividade ocasionada pelos surtos em determinadas regiões como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, estados que detêm o maior rebanho de suínos segundo a Associação Brasileira da Indústria produtora e exportadora de carne suína, provocando prejuízos econômicos com gastos com medicamentos, alta mortalidade de suínos de recria e condenação de carcaças (16).

Diante deste cenário, é importante destacar que a Suinocultura Industrial é uma das atividades mais expressivas do agronegócio Brasileiro. O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo (Tabela 1), com 3,3 milhões de toneladas produzidas anualmente e deste total, aproximadamente 600 mil toneladas são exportadas para 70 países (17). No quarto trimestre de 2017 o principal destino da carne foi Rússia (34,6% de

participação), seguida de Hong- Kong e China (17). Esses três países totalizam 63,1% do mercado importador de carne suína do Brasil (18). Portanto, o conhecimento e o controle do *H. parasuis* nesta espécie são de elevada importância, assumindo que a infecção causada por este agente pode comprometer a sanidade suína e afetar significativamente a economia do país.

**Tabela 1.** Dados de produção e exportação de suínos no Brasil nos anos de 2014 a 2016.

<b>Local</b>	<b>Ano</b>	<b>Produção (mil ton)</b>	<b>Exportação (mil ton)</b>	<b>Exportação/ Receita (milhões US\$)</b>
<b>Brasil</b>	2014	3.471,7	505,8	1.606
	2015	3.643	555,1	1.279
	2016	3.731	732,9	1.483

Fonte: ABPA, 2017.

### 2.1.2 Etiologia

O *H. parasuis* é uma bactéria Gram negativa, não hemolítica, imóvel, microaerófila e pertencente à família *Pasteurellaceae*. Morfologicamente apresenta-se bastante pleomórfico, variando de simples coco-bacilos a longas e filamentosas cadeias bacilares. O cultivo de *H. parasuis* não é convencional e exige meios de cultivo suplementados com nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD ou fator V da coagulação). Ágar chocolate, ágar Nicolet e ágar ou caldo PPLO (*pleuropneumonia like-organism*) suplementado com NAD e glicose são os meios mais utilizados para cultivar este microrganismo (19). Na ausência destes meios enriquecidos, pode-se utilizar ágar sangue contendo uma estria central de *Staphylococcus aureus* (produtor de NAD), e neste caso, as colônias de *H. parasuis* crescem ao seu redor da estria de *S. aureus*, gerando o fenômeno conhecido por “*Satelitismo*” (19). Após um período de incubação de 24-48 horas a 37°C em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>, as colônias são pequenas, translúcidas e não hemolíticas (20).

A identificação desta espécie é baseada nas características morfológicas e bioquímicas. *H. parasuis* é um microrganismo negativo para produção de urease, oxidase e indol, positivo para produção de catalase, e não realiza a redução de nitratos a nitritos. Com relação aos carboidratos, é um fermentador de glicose, galactose, manose, frutose, sacarose e maltose (21).

Para a classificação fenotípica de *H. parasuis* o método mais utilizado é a sorotipagem embora a tipificação molecular tem substituído progressivamente as técnicas sorológicas

clássicas. A sorotipagem pode ser realizada pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), conhecida como esquema de Kielstein-Rapp-Gabrielson (KRG) (22). Assim, utilizando-se antígenos autoclavados relacionados a polissacarídeos capsulares ou da membrana externa, as amostras são classificadas em quinze sorovares denominados de 1 a 15. Apesar da técnica de IDGA ser o método globalmente aceito, um número importante de reações cruzadas entre diferentes sorovares são observadas neste método, limitando o seu uso pelo alto número de cepas clínicas não sorotipificáveis (NS) (22).

A partir desta limitação, a hemaglutinação indireta (HI) foi padronizada para sorotipificar o *H. parasuis*. Esta técnica baseia-se na adsorção espontânea de antígenos de *H. parasuis* sobre a membrana citoplasmática eritrócitos ovinos (SRBC) (23,24,25). Em ambas as técnicas, antígenos termoestáveis do microrganismo alvo de tipificação são enfrentados à um painel de antissoros policlonal específico para cada sorovar de referência de *H. parasuis* (26).

Mais recentemente, nosso grupo propôs uma modificação na técnica clássica de HI de modo a aumentar resolução do teste, bem como, repetitividade desta técnica entre laboratórios. A modificação realizada consistiu em utilizar o ácido tânico para tratar previamente os eritrócitos ovinos e deixá-los com maior capacidade de adsorver os antígenos de *H. parasuis*. Os resultados desta modificação demonstraram (a) que o processo de adsorção é mais estável e (b) melhora a capacidade de atribuição de sorovares específicos aos isolados clínicos (27).

### 2.1.3 Epidemiologia no Brasil

O *H. parasuis* está amplamente distribuído no mundo e dentro da espécie “*parasuis*”, quinze sorovares (SVs) diferentes são descritos, levando em consideração a composição dos polissacarídeos capsulares ou daqueles vinculados à membrana externa (22). Recentemente, utilizando uma PCR longa desenhada sobre os genes *funA* e *wza*, os quais estão localizados no começo e ao final do locus que contém os genes que codificam a cápsula de *H. parasuis*, 9 novos padrões capsulares foram propostos, aumentando ainda mais a diversidade fenotípica deste patógeno (28). Além desta diversidade, também existem diferenças em relação a virulência dos sorovares. Os SVs 1, 5, 10, 12, 13 e 14 são altamente virulentos; os SVs 2, 4, 8 e 15 são considerados moderadamente virulentos, e os SVs 3, 6, 7, 9 e 11 são classificados como de baixa virulência ou mesmo, não virulentos (22).

No Brasil, há poucos estudos sobre a distribuição e prevalência de sorovares de *H. parasuis*. Santos *et al.* (1997) tipificaram 321 isolados clínicos de *H. parasuis* e os SVs mais encontrados foram 1, 4, 5 e 12 e 8,7% das cepas foram não tipificáveis (NS) (29). Por outro

lado, Macedo *et al.* (2011) sorotificaram por IDGA 63 isolados clínicos entre os anos de 2000 a 2007 e, descreveram a ocorrência dos SVs 1, 2, 4, 5, 6, 9 e 14, todos considerados de virulência moderada à alta (30). Na mesma linha, Moreno *et al.* (2011) tipificaram 50 isolados procedentes de 21 granjas da região centro-oeste e encontraram os SVs 2, 4, 5, 13, 14 (31). Mais recentemente, Lorenson *et al.* (2016) através da técnica HIM demonstraram a circulação dos SVs 1, 2, 4, 5, 12, 14 no estado do Rio Grande do Sul (27). Nas três pesquisas mais recentes o SV4 foi o mais prevalente (27,30,31).

Em 2017, nosso grupo analisou 460 cepas clínicas de *H. parasuis* provenientes de dez estados brasileiros e demonstrou que os SVs mais prevalentes relacionados com surtos de DG no país são os SVs 4 (26.6%), NS (17.6%), SV 1 (13.1%), SV 14 (12.6%) e SV 5 (10.7%) (28). Os SV2 e SV 13 foram detectados apenas em SC, MT e MG, enquanto que o SV 12 foi restrito ao RS (28).

#### **2.1.4 Patogenia e fatores de virulência**

O *H. parasuis* coloniza o trato respiratório superior dos suínos saudáveis durante as primeiras semanas de vida, e a infecção sistêmica é prevenida pela presença de anticorpos maternos transferidos pelo colostro (32). No entanto, o decréscimo dos títulos de anticorpos especialmente entre a quarta a sexta semana após o desmame pode predispor o desenvolvimento da doença de Glässer. Por outro lado, alguns animais tornam-se portadores assintomáticos do *H. parasuis* e passam a ser uma fonte de infecção para os suínos susceptíveis na creche (23). A transmissão ocorre principalmente do contato direto entre os animais (22) e fatores como estresse, transporte, quedas de temperatura, misturas de lotes de várias origens durante a fase de creche, são fatores predisponentes para a ocorrência de doenças respiratórias em suínos e, entre elas, a DG (34).

A patogênese bacteriana envolve múltiplos mecanismos até o estabelecimento da doença, como a entrada do patógeno no hospedeiro, invasão das defesas do organismo, multiplicação da bactéria e danos dos tecidos (35). No que se refere ao *H. parasuis*, pouco se sabe sobre os mecanismos de patogenicidade envolvidos na patogênese da infecção. No entanto, hoje é de comum acordo que o sítio inicial de colonização seja a mucosa do trato respiratório superior (36).

Com intuito de entender os mecanismos envolvidos na patogênese da infecção, Frandoloso *et al.* (2011) utilizaram ensaios funcionais para comparar o potencial de adesão e invasão de cepas virulentas e não virulentas em células epiteliais e endoteliais. Os resultados

destes estudos demonstram que *H. parasuis* possui mecanismos capazes de alterar a morfologia das células PK-15 e que estas alterações são necessárias para aumentar a aderência do patógeno. Estas alterações não acontecem em células endoteliais, no entanto, em ambas células o *H. parasuis* consegue se internalizar (37,38).

Ao colonizar a mucosa respiratória o *H. parasuis* utiliza uma protease capaz de clivar a região Fab da imunoglobulina A (IgA) (39) e assim evadir a principal defesa específica presente neste sítio. Após, dependendo da virulência do sorovar, o microrganismo migra para o ouvido médio ou a traqueia desencadeando um processo inflamatório que induz a liberação de interleucinas IL-6 e IL-8. Como consequência, alterações vasculares são induzidas, as quais facilitam a entrada do patógeno no sistema circulatório, bem como, sua difusão sistêmica (36). Cepas virulentas de *H. parasuis* são capazes de reduzir a atividade fagocítica de macrófagos alveolares, favorecendo a persistência bacteriana e multiplicação nos pulmões (35, 40). Por outro lado, embora exista um retardo no processo de fagocitose, o mesmo não ocorre em relação a produção de mediadores pró-inflamatórios liberados pelos macrófagos, os quais contribuem para a doença (40).

A virulência associada à lipooligosacarídeos (LOS) e ou outros polissacarídeos parece ser variável conforme o sorovar (35). Biologicamente, o LOS de *H. parasuis* está associado ao processo de adesão e indução das interleucinas IL-8 e IL-6, moléculas que desempenham um papel importante na inflamação e no desenvolvimento de lesões típicas observadas na DG (41). Um fator determinante para a sobrevivência e replicação de *H. parasuis* no hospedeiro consiste na sua capacidade de adquirir Ferro. O ferro é um nutriente essencial para a sobrevivência de todos os seres vivos pois participa de importantes processos biológicos que vão desde a geração de energia e replicação do DNA até o transporte de oxigênio e proteção contra o estresse oxidativo (42). O *H. parasuis* possui um sistema de captação de ferro baseado em duas proteínas com alta afinidade pela transferrina suína localizadas na membrana externa, as quais são denominadas de Tbps (*transferrin binding proteins*) A e B. A proteína TbpA consiste numa proteína integral de membrana que forma um poro conectando o espaço extracelular com o periplasmático. A segunda proteína é TbpB, uma lipoproteína que está ancorada na membrana externa e tem como função capturar a transferrina suína carregada com ferro (halo transferrina) (42).

Durante o processo de infecção, o *H. parasuis* aumenta a expressão destas duas proteínas de modo a superar a nutrição imunológica e assim conseguir adquirir ferro a partir da transferrina. Xie *et al.* (2009) sugeriram que a restrição de ferro pode sinalizar a colonização bacteriana, pois verificaram que além da expressão do operon *tonB-exbBD-tbpAB*, também

ocorre a expressão dos genes *yfeCD* e *plA*, os quais estão relacionados com a síntese de cápsula e fimbrias, respectivamente (43).

Em razão da importância do sistema de aquisição de ferro para a sobrevivência de *H. parasuis* no hospedeiro, as proteínas TbpA e TbpB consistem em alvos ideais para o desenvolvimento de vacinas de última geração. Nesta linha, nosso grupo desenvolveu um antígeno vacinal mutante baseado na proteína TbpB e demonstrou *in vivo* sua capacidade de proteção contra dois sorovares virulentos de *H. parasuis*, SV5 e SV7 (44). Além dos estudos na espécie alvo, Barasuol et al (2017) demonstraram os mecanismos efetores mediados por IgGs específicas contra a proteína TbpB capazes de matar cepas virulentas de *H. parasuis*.

### **2.1.5 Sinais clínicos**

Os animais acometidos pelo *H. parasuis* podem apresentar sinais clínicos variados, dependendo da virulência da cepa clínica e do nível de susceptibilidade do hospedeiro. Comumente são observados os seguintes sinais clínicos: aumento da temperatura corporal, apatia, inapetência, anorexia, articulações inflamadas, manqueira, espirros e tosse, tremores, incordenação motora, perda de peso e ocasionalmente cianose. Em alguns casos morte súbita pode ocorrer e os animais que sobrevivem a fase aguda da doença normalmente desenvolvem lesões sistemas de poliserosites, as quais podem resultar na condenação da carcaça (33).

### **2.1.6 Lesões macroscópicas e microscópicas**

As principais lesões macroscópicas encontradas em suínos com doença de Glässer incluem: pleurite, pericardite, peritonite, poliartrite e meningite, com exsudação fibrinosa ou serofibrinosa em uma ou múltiplas superfícies serosas, e as vezes áreas de pneumonia hemorrágica (20). Também são observados frequentemente no fígado, rins e meninges petéquias ou equimoses características de septicemia aguda, além de sinais de cianose (36, 45).

Na microscopia das serosas afetadas verifica-se exsudatos compostos por fibrina e infiltrado de neutrófilos e macrófagos (45).

### 2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clássico é baseado no histórico clínico do rebanho, sinais clínicos, necropsia e isolamento bacteriano. O isolamento bacteriano é difícil, o método requer o uso de “swab” estéril e com meio de transporte do tipo Stuart para diminuir a contaminação (33) na coleta da amostra de exsudatos serosos do pericárdio, pleura, peritônio, articulação e líquido cérebro-espinhal (34). É importante amostrar animais doentes e que não estejam recebendo tratamento com antimicrobianos (carência mínima de 7 dias) e evitar coletar amostras de animais que morreram naturalmente pela enfermidade, já que de suínos mortos tem-se menor sucesso no isolamento de *H. parasuis* (20).

A interpretação dos resultados deve ser cautelosa. Por trata-se de um microrganismo comensal do trato respiratório superior dos suínos, existem diferenças importantes em termos de virulência entre cepas isoladas no trato respiratório superior, do pulmão e de sítios sistêmicos (33). A definição do sorovar de *H. parasuis* relacionado com a doença clínica deve ser realizado através do isolamento e tipificação de cepas recuperadas de sítios sistêmicos, preferencialmente de articulações, peritônio, pericárdio e meninges (34).

### 2.1.8 Tratamento e prevenção

O controle das infecções produzidas pelo *H. parasuis* é realizado com o uso de vacinas, antimicrobianos (especialmente através de antimicrobianos adicionados à ração ou à água) e boas práticas de manejo. Porém, as vacinas comerciais disponíveis no Brasil garantem proteção restrita à alguns SVs, podendo não serem eficazes em granjas que apresentam SVs diferentes daqueles incluídos na composição vacinal. Nesse sentido pesquisas vêm sendo conduzidas a fim de produzir vacinas capazes de conferir ampla proteção heteróloga contra *H. parasuis* (37).

Em razão das constantes falhas de proteção conferidas pelas vacinas comerciais na prevenção da doença de Glässer, o uso de antibióticos é cada vez mais frequente, gerando diversos problemas como bioacumulação e mobilidade no solo favorecendo a disseminação de genes de resistência, contaminação do meio ambiente, e estas bactérias resistentes de origem animal podem atingir a população humana e ocasionar falhas terapêuticas no tratamento de enfermidades, aumentando as estadias hospitalares e tornando mais caro o tratamento de resistência a antimicrobianos (5).

## 2.2 HAEMOPHILUS PARASUIS E ANTIMICROBIANOS

### 2.2.1 Uso de antimicrobianos na suinocultura

Na suinocultura, o uso de antimicrobianos engloba quatro formas de medicação: promotora de crescimento, metafilática, profilática e terapêutica. No sistema de promoção de crescimento animal utiliza-se antimicrobianos em baixas dosagens incorporados via água ou ração, como modo de promover o desenvolvimento e o ganho de peso diário. Acredita-se que ocorra uma série de modificações na microbiota intestinal dos suínos, com menor atividade imunológica na mucosa intestinal, sendo que esta pode gerar gastos metabólicos significativos (46). Já na aplicação metafilática, a detecção dos primeiros sinais clínicos de um animal doente envolve o uso da medicação a este animal e a todos os presentes no pavilhão ou no lote (46). A forma profilática é adotada com intuito de diminuir a probabilidade da ocorrência da doença e o estabelecimento dos sinais clínicos, fornecendo doses terapêuticas por período de tempo curto (46). Por fim, a terapêutica consiste em aplicar a medicação aos suínos doentes para garantir a saúde e bem-estar dos animais (46).

O modelo atual de produção suína, caracterizado pela criação intensiva e em confinamento, é uma atividade de grande potencial poluidor, por produzir resíduos com elevada carga de nutrientes (fósforo e nitrogênio), matéria orgânica, patógenos, metais pesados (cobre e zinco), hormônios e antimicrobianos (47). Muitas moléculas antimicrobianas não são totalmente metabolizadas no organismo animal sendo excretados na urina e fezes. Uma vez no ambiente, esses resíduos podem acumular-se no solo, água superficial e subterrânea (47). E, dependendo da característica química da molécula antimicrobiana, pode sofrer menor potencial de bioacumulação e maior mobilidade no solo favorecendo a disseminação de genes de resistência, além de causar problemas de ordem toxicológica a determinados organismos vivos (48).

Existe hoje a percepção, quase que generalizada, de que há excesso de uso de antimicrobianos na produção de suínos e de que providências deveriam ser tomadas para reduzir esse uso, porque alguns dos mesmos antimicrobianos são utilizados também na medicina humana, elevando o risco de surgimento e disseminação de bactérias resistentes (49).

Diante deste fato, há uma preocupação frente ao aumento nas taxas de resistência antimicrobiana. Desde 2006, a União Europeia proibiu o uso de antimicrobianos para promoção de crescimento. Os consumidores também estão impulsionando a demanda por carne sem o uso



rotineiro desses medicamentos. O uso generalizado de antimicrobianos em seres humanos e animais contribuem para este problema, tornando-se uma grave ameaça à Saúde Pública (9).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), desenvolveu orientações para o uso racional de antimicrobianos nos setores humano, animal e agrícola (9). Atualmente, recomenda-se o uso prudente de antimicrobianos para promover o crescimento e prevenir doenças em animais saudáveis, como uma forma de racionalizar a terapia veterinária e ajudar a preservar a eficácia dos antimicrobianos importantes para a medicina humana e veterinária, evitar a resistência bacteriana, prevenir resíduos acima dos limites toleráveis em produtos animais destinados ao consumo humano e a prevenção a poluição ambiental (9,46).

A Organização Mundial de Epizootias (OIE), em paralelo com o plano de ação da OMS publicou a estratégia em resistência aos antimicrobianos e o uso prudente de antimicrobianos, reconhecendo a importância de um enfoque que considere as necessidades da saúde humana, saúde animal, da agricultura e do meio ambiente (49).

### **2.2.2 Uso de antimicrobianos no tratamento da doença de Glässer**

Antimicrobianos são usados para o controle e tratamento da DG em suínos (50). No Brasil, atualmente, as moléculas mais utilizadas para o tratamento das infecções produzidas pelo *H. parasuis* são: amoxicilina, ceftiofur, eritromicina, doxiciclina, florfenicol, marbofloxacin, penicilina, sulfa-trimetropim, tulatromicina, tetraciclina, tilmicosina e tildipirosina. E dentre estes, a molécula mais nova em uso no mercado brasileiro é a tildipirosina, a qual começou a ser comercializada na suinocultura em 2015 (13) e consiste num antibiótico promotor para ser utilizado em granjas com histórico de bactérias respiratórias multirresistentes.

Em razão da importância dos antimicrobianos no tratamento da DG, apresentamos na tabela 2 uma revisão sobre a eficácia de diferentes antibióticos sobre isolados clínicos de *H. parasuis* avaliados em diferentes países (50, 51, 52, 53,54,55,56,57,58).

A eficácia de uma molécula farmacológica é descrita pela resposta terapêutica potencial máxima que um fármaco pode induzir o seu efeito terapêutico (59). Diante dos dados apresentados na tabela 2, observa-se que as principais moléculas utilizadas no combate a bactéria *H.parasuis*, por exemplo: amoxicilina, enrofloxacin, norfloxacin, penicilina, tetraciclina, tilmicosina e tiamulina têm perdido progressivamente sua eficácia na terapia desta infecção bacteriana. Além do mais, algumas já se apresentam ineficazes como: ácido nalidíxico, estreptomicina e tilosina, conseqüentemente com falha na resposta terapêutica. E outras

moléculas como: a enrofloxacina, eritromicina, norfloxacina, tulatromicina e sulfatrimetroprim apesar de ainda apresentarem uma certa eficácia contra o patógeno há presença de ineficácia terapêutica que pode resultar em resistência bacteriana principalmente através do uso imprudente destes fármacos.

**Tabela 2.** Resumo dos resultados de 10 diferentes estudos sobre perfil de susceptibilidade ou resistência de isolados clínicos de *H. parasuis* a moléculas antimicrobianas usadas na clínica.

<b>Molécula</b>	<b>%R (mínima-máxima)</b>	<b>Autor</b>
Amoxicilina	0-75	Millan <i>et al</i> , 2007
		Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
		Xu <i>et al</i> , 2011
Amoxicilina/Clavulanato	6,6	Brodgen <i>et al</i> , 2018
Ácido Nalidíxico	36,7- 84,8	Xu <i>et al</i> , 2011
		Zhao <i>et al</i> , 2018
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
		Xu <i>et al</i> , 2011
		Zhou <i>et al</i> , 2010
Ampicilina	0-56,7	Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
		Dayao <i>et al</i> , 2014
		Aarestrup <i>et al</i> , 2004
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
		De la fuente, <i>et al</i> , 2006
		Miani <i>et al</i> , 2017
		Zhou <i>et al</i> , 2010
Nedbalcová <i>et al</i> , 2013		

Ceftiofur	0-29,2	Aarestrup <i>et al</i> , 2004 Brodgen <i>et al</i> , 2018 De la fuente <i>et al</i> , 2006
Clindamicina	6	Miani <i>et al</i> , 2017  Xu <i>et al</i> , 2011 Zhou <i>et al</i> , 2010
Ciprofloxacina	0-41,1	Aarestrup <i>et al</i> , 2004 Brodgen <i>et al</i> , 2018 Zhao <i>et al</i> , 2018  Xu <i>et al</i> , 2011 Zhou <i>et al</i> , 2010 Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
Enrofloxacin	0-70,9	Brodgen <i>et al</i> , 2018 Miani <i>et al</i> , 2017 Zhao <i>et al</i> , 2018 De la fuente <i>et al</i> , 2006  Xu <i>et al</i> , 2011
Eritromicina	0-34,7	Zhou <i>et al</i> , 2010 Dayao <i>et al</i> , 2014 Aarestrup <i>et al</i> , 2004 De la fuente, <i>et al</i> , 2006 Miani <i>et al</i> , 2017

	0-23	Aarestrup <i>et al</i> , 2004 De la fuente, <i>el al</i> , 2006 Miani <i>et al</i> , 2017
Espectinomicina		
	48,2	Xu <i>et al</i> , 2011  Xu <i>et al</i> , 2011 Zhou <i>et al</i> , 2010 Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
Estreptomicina		
	0-18	Aarestrup <i>et al</i> , 2004 Brodgen <i>et al</i> , 2018 De la fuente, <i>et al</i> , 2006 Miani <i>et al</i> , 2017  Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
Florfenicol		
	2,4-84	Brodgen <i>et al</i> , 2018 De la fuente, <i>et al</i> , 2006 Miani <i>et al</i> , 2017
Gentamicina		
	6,4-20,2	Zhou <i>et al</i> , 2010 Zhao <i>et al</i> , 2018
Levofloxacin		

Lincomicina	42	Miani <i>et al</i> , 2017
		Xu <i>et al</i> , 2011
Norfloxacino	22,3-38,4	Zhao <i>et al</i> , 2018
		Zhou <i>et al</i> , 2010
		Dayao <i>et al</i> , 2014
		Aarestrup <i>et al</i> , 2004
Penicilina	0-83,3	Brodgen <i>et al</i> , 2018
		Millan <i>et al</i> , 2007
		De la fuente <i>et al</i> , 2006
		Miani <i>et al</i> , 2017
		Zhou <i>et al</i> , 2010
		Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
Tetraciclina	0-27,7	Dayao <i>et al</i> , 2014
		Aarestrup <i>et al</i> , 2004
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
		Miani <i>et al</i> , 2017
		Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
		Dayao <i>et al</i> , 2014
Tilmicosina	0-40	Aarestrup <i>et al</i> , 2004
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
		De la fuente <i>et al</i> , 2006
		Miani <i>et al</i> , 2017

		Aarestrup <i>et al</i> , 2004
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
Tiamulina	0-40	De la fuente <i>et al</i> , 2006
		Miani <i>et al</i> , 2017
		Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
		Nedbalcová <i>et al</i> , 2013
Tulatromicina	3,6-16,6	Dayao <i>et al</i> , 2014
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
Tilosina	20	Miani <i>et al</i> , 2017
		Xu <i>et al</i> , 2011
		Zhou <i>et al</i> , 2010
		Dayao <i>et al</i> , 2014
Sulfa-Trimetropim	0-58	Aarestrup <i>et al</i> , 2004
		Brodgen <i>et al</i> , 2018
		De la fuente <i>et al</i> , 2006
		Miani <i>et al</i> , 2017

---

%R- porcentagem de resistência

Portanto, apesar do arsenal terapêutico disponível no mercado, as opções para o tratamento da DG estão se reduzindo. Por isso, faz-se necessário o antibiograma para o rebanho, pois a sensibilidade ao fármaco pode variar de acordo com a cepa presente. Além do mais, apenas alguns antibacterianos foram desenvolvidos especificamente para saúde e produção animal devido aos enormes custos de desenvolvimento de antimicrobianos (por exemplo: enrofloxacina, tilosina, tiamulina, tilmicosina, ceftiofur, tulatromicina, tildipirosina) (60). A grande maioria dos antimicrobianos é de utilização humana e animal tornando-se o uso irracional destes fármacos uma ameaça à Saúde Pública. Contudo, existe apenas 1 estudo sobre susceptibilidade antimicrobiana em *H. parasuis* no Brasil (8).

### 2.2.3 Relação entre o uso de antimicrobianos e ocorrência de resistência

O termo *antimicrobiano* define-se como qualquer substância de origem natural, semissintética ou sintética que mata ou inibe o desenvolvimento de um microrganismo, provocando pouca ou nenhuma lesão ao hospedeiro (60, 61). Já o termo *resistente* refere-se a aqueles microrganismos que não se inibem pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual perde-se a capacidade de resposta clínica eficaz (60).

Em meados de 1930, com a descoberta de Penicilina e, posteriormente liberação da primeira sulfonamida, houve uma revolução no tratamento de doenças infecciosas (61). Entretanto, logo foi observado que as bactérias podiam tornar-se resistentes aos antimicrobianos, e cepas resistentes foram emergindo após a introdução de novos fármacos (9). O fármaco antimicrobiano ao penetrar na célula alvo e desempenhar sua função, exerce uma pressão seletiva em que são eliminadas as bactérias susceptíveis, mas não as resistentes. O agravamento do nível de resistência a um determinado grupo farmacológico deve-se a sua utilização excessiva e muitas vezes errônea praticada ao longo de décadas e é um dos grandes desafios no presente século (62).

A habilidade bacteriana em utilizar diversas estratégias responsáveis por torná-las resistente aos antimicrobianos é um processo de seleção natural e possui origem genética (60).

A resistência pode ser classificada como intrínseca (natural), baseada em genes presentes no cromossomo, e decorre de um fator inerente estrutural ou funcional associado a espécie, gênero ou grupo bacteriano, ou adquirida devido a uma mutação do DNA ou através da aquisição de genes por elementos genéticos móveis extra cromossomais (plasmídios, fagos,

transposons e integrons) (60). Certos elementos móveis extra-cromossomais codificantes de resistências podem se autorreplicar dentro da célula e serem facilmente transferidos (por transformação ou transdução) entre bactérias. Esta transmissão pode ocorrer inclusive entre bactérias comensais não patogênicas e bactérias patogênicas (61). Os genes de resistência codificam diversos mecanismos que permitem às bactérias sobreviver em presença de antibióticos, entre eles merecem destaque a alteração na permeabilidade de membrana, ação enzimática (modificação ou degradação da molécula), bombas de efluxo e modificação do alvo (60).

A rotina de administração de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistência em *H. parasuis* foi abordado recentemente na China; aquele estudo reportou pela primeira vez a resistência ao florfenicol. A resistência foi atribuída a um novo plasmídeo com similaridade a outros plasmídios da família *Pasteurellaceae* portando o gene *florR* (58). Apesar de vários países terem realizado estudos de susceptibilidade antimicrobiana de *H. Parasuis* com relatos de isolados clínicos susceptíveis ao florfenicol, (55,52, 50, 56, 53), esta molécula já apresenta prevalência de resistência sugerindo-se a troca de elementos genéticos entre espécies de *Pasterellaceae* associadas a infecções respiratórias em suínos (63).

#### **2.2.4 Impacto da resistência na cadeia produtiva e saúde pública**

Os antimicrobianos são essenciais para a saúde humana e animal. Na produção animal, o uso de antimicrobianos pode produzir benefícios, como prevenção e controle de infecções entéricas, produção de alimentos mais seguros, maior bem-estar animal, maior eficiência de produção e menor custo de produção (46). Mas, existe um elevado risco de ocorrência de falha terapêutica em humanos, devido a transferência de bactérias resistentes pela cadeia alimentar (61). Por isso, o seu uso deve ser exclusivamente para o tratamento da doença.

Entretanto, a emergência e a disseminação da resistência bacteriana associadas com as dificuldades encontradas na descoberta de novos agentes antimicrobianos representam os maiores desafios dos últimos anos. Os trabalhadores da indústria da carne, tratadores de animais e veterinários costumam ter um grau de resistência a antimicrobianos maior do que a população em geral, particularmente no caso das bactérias entéricas, uma vez que bactérias de origem animal podem atingir a população humana de várias formas: através da contaminação de fontes hídricas, contaminações no abate, efluentes de granjas e outros (64).

Porém, torna-se quase impossível de quantificar a transferência dessa resistência pelo fato de que os animais e humanos recebem o mesmo tipo de antimicrobiano, sendo colonizados



por bactérias comuns ou espécies estreitamente relacionadas, e seus ambientes não são separados (61).

A resistência a um agente antimicrobiano pode ser selecionada para outro agente através de dois mecanismos: seleção cruzada e cosseleção. (61). Na Dinamarca, por exemplo, demonstrou-se que ao banir o uso de avoparcina na suinocultura houve no período de dois anos uma redução significativa da resistência de vancomicina em *enterococcus* humanos (5).

A seleção cruzada refere-se a presença de um único gene de resistência conferindo resistência a dois ou mais antimicrobianos, em geral pertencente a mesma classe farmacológica, por exemplo: tilosina licenciada para uso em animais tem habilidade de selecionar de forma cruzada para a resistência de fármacos relacionados estruturalmente como a eritromicina (macrolídeo) usado na medicina humana (61). Já a cosseleção deve-se a coexistência de distintos genes ou mutações na mesma cepa bacteriana conferindo resistência a diferentes classes farmacológicas, como exemplo: a tilosina e a tetraciclina co-selecionam para a resistência aos glicopeptídeos em enterococos suínos, uma vez que os genes que conferem resistência (*ermB* e *tetM*, respectivamente) são frequentemente localizados em plasmídeos carreando o gene *vanA* de resistência aos glicopeptídeos (61).

Os profissionais da saúde desempenham uma função fundamental na conservação da eficácia dos agentes antimicrobianos. Todavia, a carência de informações atualizadas e de testes susceptibilidade antimicrobiana pode dificultar a identificação do tipo de infecção e gerar uma prescrição indevida e excessiva destes medicamentos (62). Ressalto que muitas das infecções são causadas por vírus sendo a sua cura atribuída ao período de incubação do agente etiológico e da imunidade do indivíduo, mas muitos profissionais cedem a pressão do paciente em prescrever antimicrobianos. Além do mais, o período de tratamento prescrito muitas das vezes não é obedecido e estes fatores colaboram para a resistência antimicrobiana com consequências de falha terapêutica, resultando em tratamentos mais longos, custos elevados, e maior risco de morte. Por outro lado, o prolongamento da doença aumenta o risco de contágio e desenvolvimento de multirresistências (62).

### **2.2.5 Impacto do uso de antimicrobianos no meio ambiente**

O uso de fármacos no tratamento de animais de produção intensiva e/ou em confinamento representa a principal via de entrada de antimicrobianos no ambiente, podendo ocasionar a contaminação através de seus resíduos e interferir negativamente no ecossistema (65).

Na criação de suína, os antimicrobianos podem atingir diretamente o ambiente por meio das excreções dos animais (7). Apesar das taxas de excreção dos antimicrobianos dependerem da substância administrada, via de administração, espécie animal e tempo de tratamento, muitas destas moléculas não são totalmente metabolizadas no organismo animal antes de serem eliminadas na urina/ e ou fezes e seus resíduos podem favorecer a resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos, além de causar problemas de ordem toxicológica a determinados organismos vivos (7).

Os antimicrobianos de uso veterinário são, no geral, representados por moléculas anfóteras, com vários grupos funcionais ionizáveis (diferentes  $pKa$ ), massas molares bastante variáveis e baixos potenciais de volatilização (48). Entretanto, os impactos causados por sua dispersão dependem das propriedades físico químicas de cada molécula farmacológica e atingem grandes proporções, à medida que as águas superficiais e subterrâneas, o ar, solo, plantas, organismos terrestres e aquáticos são ameaçados (7).

A principal forma de entrada de resíduos medicamentosos nos ecossistemas aquáticos ocorre pelas águas residuais, uma vez que os processos atuais de tratamento dos esgotos não são capazes de eliminar completamente os antimicrobianos. Todavia, o solo pode conter resíduos de antimicrobianos através da deposição de estrume contaminado usados como fertilizante em processos agrícolas.

No Brasil, a forma mais usual de tratamento de dejetos de suínos é o armazenamento em esterqueiras ou em lagoas e posterior aplicação no solo, onde este resíduo pode ser usado como fertilizante orgânico (66). Porém, alguns estudos demonstraram a permanência de antimicrobianos veterinários no solo. Hamscher *et al.* 2005 evidenciaram a presença de tetraciclina (TC) e oxitetraciclina (OTC) a uma profundidade de 30 cm, até 7 meses após a fertilização de solos com esterco líquido de suínos (67). Kineney *et al.* 1863 observaram a bioacumulação de trimetoprina (TMP) em minhocas após a aplicação de esterco e de lodo de esgoto ao solo (68). Também, Boonsaner e Hawker ao analisarem a presença de oxitetraciclina (OTC) em excrementos de suínos relatam que não se pode descartar que estes dejetos podem contaminar efluentes e se acumular em plantas aquáticas, muitas destas utilizadas na alimentação humana (69).

Apesar da importância da produção suína, o país carece de pesquisas na área, não dispondo, entre outros, de levantamentos sobre a ocorrência de resíduos dos principais antimicrobianos de uso veterinário no ambiente, bem como de seus possíveis efeitos sobre o ecossistema (48). Essa carência de conhecimento sobre o comportamento e impacto ambiental de antibióticos veterinários é ainda mais agravada pelo fato do Brasil apresentar

particularidades de clima e solo bastante distintas em sua amplitude continental, tornando-se clara, dessa forma, a necessidade de pesquisas na busca da qualidade e sustentabilidade da agricultura, da pecuária e do meio ambiente, o que resultará em reflexos positivos na saúde humana (48).

Contudo, apesar do desconhecimento das reais consequências à saúde humana em um período de longo prazo, é evidente através dos trabalhos publicados que a contaminação resultante do uso de antimicrobianos em animais, da dispersão de bactérias resistentes e do comportamento dos resíduos desses fármacos no meio ambiente pode vir a ser prejudicial, oferecendo riscos à saúde da população (48).

### **2.2.6 Aspectos regulatórios envolvendo o uso de antimicrobianos em animais**

A falta de informações atualizadas a respeito da produção, venda, consumo de antimicrobianos veterinários (AV) ainda é comum na maioria dos países em desenvolvimento ou sub-desenvolvidos. Entretanto, o aumento da resistência antimicrobiana (AMR) nos últimos anos vem despertando a atenção de autoridades governamentais de vários segmentos e da sociedade, em controlar o uso de antimicrobianos (9).

As práticas de manejo dos grupos animais e vegetais, bem como as de saúde humana, têm uma responsabilidade partilhada e um papel fundamental nos esforços para minimizar a seleção de resistência microbiana, seja no que tange o uso de antimicrobianos em humanos ou não humanos (61). Assim, desde 2010, a OIE, juntamente com a OMS e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), tem estado envolvida em uma aliança tripartida, através da implantação do conceito “Saúde Única” (70).

Há quase 10 anos, a OIE publicou normas intergovernamentais sobre o uso racional e prudente de antimicrobianos, esses textos abrangem o uso dos agentes antimicrobianos e programas de vigilância, monitoramento de quantidades e avaliação dos riscos de surgimento ou disseminação de bactérias resistentes como resultado de seu uso em animais, além da lista de antimicrobianos de importância veterinária considerando as preocupações na saúde humana (70). Também colabora com a Comissão Codex Alimentarius (CAC) que estabelece uma série de limites máximos de resíduos (MRL, *Maximum Residue Limit*) para alimentos. Esses MRL são estabelecidos por meio de avaliações toxicológicas e segundo recomendações do Comitê de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA. *Joint Expert Committee on Food Additives*) da FAO e OMS (9).

No Brasil, a presença de resíduos de antimicrobianos é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (12, 71). A realização de programas de monitoramento de resíduos de contaminantes em alimentos, assim como o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) do MAPA são essenciais para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, prevenindo e controlando os possíveis danos à saúde do consumidor (71). Atualmente, o MAPA autoriza cerca de 15 compostos antimicrobianos como aditivos na cadeia animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais de uso comum entre diversas espécies animais (71).

A OMS elaborou a lista de antimicrobianos de importância crítica para a medicina humana (Lista OMS de AIC-2018) baseada em revisões sistemáticas e de literatura, nesta lista são agrupados os antimicrobianos usados atualmente em humanos e animais em três categorias (“importante”, “muito importante”, e de “importância crítica”), dentre estes, as principais classes farmacológicas englobadas nestas categorias são: nitrofurantóinas, polipeptídeos cíclicos, nitroimidazólicos e pleuromutiinas; aminopenicilinas, anfenicóis, cefalosporina de primeira e segunda geração, lincosamidas, penicilina, estreptograminas e tetraciclina; cefalosporinas de terceira, quarta e quinta geração, glicopeptídeos, macrolídeos, polimixinas e quinolonas, respectivamente (72). Esta lista visa contribuir na gestão da resistência antimicrobiana e garantir o uso prudente tanto na medicina humana como também na veterinária (72).

O sucesso da luta contra a resistência antimicrobiana depende da implementação de estratégias globais pelas autoridades de saúde pública, veterinária e ambiental de todos os países nos cinco continentes. Se não tomarmos medidas hoje, em 2050 a totalidade de antimicrobianos serão ineficazes para tratar e prevenir enfermidades (9).

## 2.3 *HAEMOPHILUS PARASUIS* E ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS

### 2.3.1 Antimicrobianos macrolídeos

O termo *macrolídeo* relaciona-se com a estrutura (macro= grande; olídeo= lactona) – um anel lactona central com 12 a 16 membros, aos quais estão conectados um ou mais desoxiaçúcares, contendo compostos de origem natural e derivados semissintéticos. A classificação deste antimicrobiano é de acordo com o tamanho do anel lactona macrocíclico (60).

Os macrolídeos agem inibindo a síntese de proteínas do microrganismo, por se ligar reversivelmente ao subdomínio 23S rRNA, o qual se encontra próximo ao centro da enzima peptidil transferase presente na subunidade 50S do ribossomo bacteriano. Esta enzima catalisa a formação de ligações peptídicas durante o alongamento das cadeias polipeptídicas, dissociado consequentemente a enzima peptidil-tRNA (60,59) a qual faz a leitura do aminoácido que deve ser incluído na nova proteína em base à leitura dos códons de RNAs mensageiros. Desta forma, os macrolídeos se ligam dentro do túnel ribossômico 50S, impedido a formação de novas proteínas (73).

Os macrolídeos também são conhecidos pelo seu acúmulo intracelular nos fagócitos podendo exacerbar o efeito imunomodulador do hospedeiro (60) e exercem atividades anti-inflamatórias, inibindo a produção de várias interleucinas, inclusive a IL-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e a formação do leucotrieno B4 (60). Os macrolídeos aprovados para uso veterinário incluem: tildipirosina, tilmicosina, tulatromicina, tilosina (74). Podem ser usados azitromicina e eritromicina de uso humano (74).

### **2.3.2 Mecanismo de resistência aos macrolídeos**

Os grupos farmacológicos das tetraciclínas e macrolídeos tem-se particular interesse devido as grandes taxas de uso na medicina humana e veterinária (37% e 8%, respectivamente) (74).

De acordo com a lista da OMS de Antimicrobianos de Importância Clínica (AIC), os macrolídeos estão classificados na categoria de “prioridade crítica” e constitui-se na classe farmacológica mais utilizada no tratamento de infecções bacterianas graves em humanos, muitas das vezes a única alternativa viável de combate a infecção na atenção sanitária (72). Encontra-se no grupo de priorizações em razão dos indícios de resistência e de transmissão de genes de resistência aos humanos a partir de fontes não humanas (72). Neste sentido, é necessário a utilização de testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) para traçar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana evitando-se o seu uso desnecessário.

Existem diversos mecanismos possíveis de resistência microbiana aos macrolídeos. Porém, a resistência resulta geralmente de três mecanismos: (1) a alteração do local alvo (subunidade 50S do ribossomo bacteriano, por metilação), (2) a utilização de mecanismos de efluxo ativo do fármaco pela membrana plasmática da célula bacteriana, (3) a inativação enzimática através da degradação do anel lactona (74). Desses, a modificação do local alvo e o efluxo ativo são responsáveis pela maior parte das cepas resistentes (60). Ainda, podem ocorrer

combinações de mecanismos, como por exemplo a co-resistência entre tetraciclina e MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina), processo decorrente de determinantes genéticos para a tetraciclina e resistência a MLS em transposons, que podem interagir e recombinar, aumentando o risco de transferência de resistência a espécies patogênicas, e a co-seleção de genes e sua retenção na população, processo que leva à falha terapêutica e consequências graves (74).

Dentre os mecanismos básicos, a resistência por alteração do local alvo, ocorre através da ação da proteína codificada por uma série de genes de metiltransferase que são relacionados à metilase resistente à eritromicina (*erm*). Esse processo de resistência que ocorre em diferentes espécies de bactérias, resulta na metilação do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA), o que altera a sua conformação, impossibilitando a ligação do antimicrobiano ao ribossomo. Esses genes são amplamente distribuídos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e podem se localizar em plasmídeos e transposons (60), podendo conferir resistência cruzada entre macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (Resistência MLSB) (74).

Já o efluxo ativo é mediado pelo gene *mef*, encontrado em uma variedade de bactérias Gram-positivas e que leva ao fenótipo M, o qual induz resistência aos macrolídeos com anel de 14 e 15 membros e sensibilidade aos macrolídeos com anel de 16 membros (60). Ainda, o gene *msr* codifica para efluxo ativo de macrolídeos e estreptogramina B (74).

### 2.3.3 Tildipirosina

Tildipirosina, o princípio ativo do Zuprevo<sup>®</sup> 40 mg/ml solução injetável para suínos é um antimicrobiano macrolídeo de 16 membros e foi recentemente desenvolvido para tratamento e metafilaxia de doenças respiratórias de suínos (DRS) produzidas pelos patógenos: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* e *Haemophilus parasuis* sensíveis à tildipirosina (75). Em geral, os macrolídeos são bacteriostáticos (e raramente bactericidas), mas o efeito da tildipirosina *in vitro* contra *H. parasuis* é bactericida (13).

De acordo com os princípios de uso racional de medicamentos, tem-se realizado o tratamento metafilático apenas em surtos graves de DRS afim de prevenir o desenvolvimento de sinais clínicos e a propagação da doença (13). A eficácia do uso metafilático do Zuprevo<sup>®</sup> foi comprovado por ensaio de campo multicêntrico controlado com placebo em um caso de surto de DRS que afetou pelo menos 30% dos animais de uma granja. Após a metafilaxia

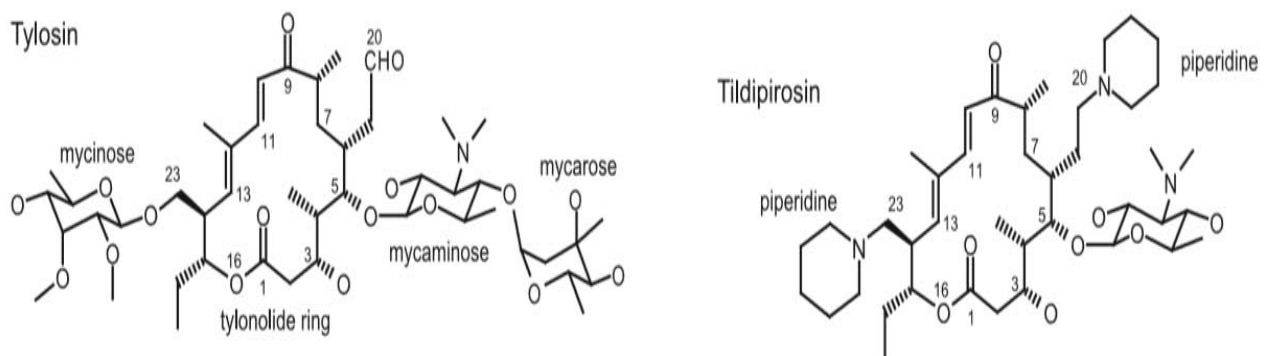
aproximadamente 86% dos animais sadios permaneceram livres de sinais clínicos da doença em comparação com 65% do grupo controle não tratados (13).

A administração do fármaco consiste em injeção intramuscular de 4 mg de tildipirosina/kg de peso corporal (equivalente a 1 mL/10kg de peso corporal) em dose única, não se excedendo 5 mL por local de injeção (13). O local de injeção recomendado é atrás da orelha no ponto mais alta da base na transição da zona sem pelo para a zona com pelo. Além disso, recomenda-se que os animais sejam tratados nas fases mais precoces da doença e que a resposta farmacológica seja avaliada nas 48 horas após a administração. Diante da persistência dos sinais clínicos no rebanho, o tratamento deve ser alterado utilizando-se outro antimicrobiano com mecanismo de ação diferente, porque a associação de macrolídeo com antimicrobianos de mecanismo de ação semelhante, como macrolídeos e lincosamidas pode resultar em interação medicamentosa ocasionando uma resistência cruzada (13).

#### 2.3.4 Propriedades farmacodinâmicas

A tildipirosina é um antimicrobiano macrolídeo semissintético com 16 átomos de carbono derivado do composto natural tilosina, com dois anéis de piperidina e sem o açúcar micarose (Figura. 1) (76). Apesar da semelhança estrutural, a tilosina não é indicada para tratar infecções por agentes patogênicos Gram-negativos, geralmente, devido a sua capacidade limitada de penetrar a membrana externa destas bactérias (73).

**Figura 1.** Estrutura do composto macrolídeo natural tilosina (a direita) e o seu composto semissintético tildipirosina (a esquerda).



Fonte: POEHSGAARD *et al.*, 2012.

A Tildipirosina, por outro lado, mostra melhor eficácia contra os agentes patogênicos Gram-negativos (73). Estruturalmente, possui carácter tribásico que é resultante dos três

substitutos amina no anel lactona (Figura. 2) (75), os quais conferem elevada basicidade a molécula e garantem uma maior penetração do fármaco no interior da célula bacteriana. Além disso, o anel de 16 átomos de carbono a torna uma molécula grande com capacidade de iludir os mecanismos de resistência bacteriana e aumentar a eficácia terapêutica (75). Mecanismos de resistência codificados por *msr* (*E*) e *mph* (*E*) mostram pouca ou nenhuma atividade contra macrolídeos de 16 membros, e assim a tildipirosina permanece efetiva contra cepas que abrigam estes determinantes (73).

**Figura 2.** Estrutura molecular da tildipirosina (C<sub>41</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>).



Fonte: Domínio Público

Além da capacidade de penetração na membrana bacteriana e de burlar os mecanismos de resistência, outras importantes propriedades farmacodinâmicas deste antimicrobiano são definidas pela ligação alvo-droga. Porém, há falta de informações estruturais disponíveis da interação de tildipirosina dentro da subunidade ribossômica de *H. parasuis*. Poehlsgaard et al., (2012) definiram a interação droga-alvo de acordo com a estrutura da tildipirosina e mostraram que os fármacos macrolídeos (tilosina, tilmicosina) interagem no mesmo local do túnel ribossômico em *Pasteurella multocida* e *Escheria coli*, porém, há diferenças na ocupação deste sítio, em razão da estrutura química e dos seus substituintes (73).

Na molécula de tildipirosina os substituintes da piperidina presentes unicamente neste macrolídeo a distinguem da tilosina e tilmicosina e são estas estruturas que exercem a interação droga-alvo de acordo com o seu estado de protonação, a 23-piperidina contata os resíduos do ribossomo na parede do túnel enquanto a 20-piperidina é angulada para o lúmen do ribossomo formando uma barreira para a cadeia peptídica recém-sintetizada conforme ela tenta sair do ribossomo (73).



Outro estudo, avaliou a eficácia da TIP na inibição da síntese de proteínas no ribossomo de *Escheria coli* em comparação com outros macrolídeos veterinários. Os resultados demonstraram o IC<sub>50</sub> (0,023±0,01 µM) para inibir a proteína GFP ribossomal, além de evidenciar os efeitos da mutação e metilação de rRNA no local de ligação, provocando diferenças nas interações alvo-droga, como por exemplo, a substituição ou metilação no nucleotídeo A258 ocasionou o aumento na concentração de MIC conferindo maior resistência a todos macrolídeos, pois esses fármacos remetem a sua interação primária a esse nucleotídeo (76). Além disso, metilações em A2058 e G748 provavelmente interferem no processo prévio de ligação ao sítio (77). A metilação de G748 causa um choque estérico com a 23-micinosose e confere uma resistência leve a tilosina (78). Já no caso da TIP (Fig.1), a 23-piperimidina substitui o 23-micinosose presente na tilosina e essa parte da droga foi calculada para ser um pouco mais longe do G748, dificultando a sua interação (73).

### 2.3.5 Propriedades farmacocinéticas

Após a administração por via intramuscular de 4mg/kg de peso corporal em dose única em suínos, a TIP é rapidamente absorvida. O tempo necessário para alcançar os picos de concentrações plasmáticas máximas de 0,9 µg/mL é de 23 minutos (T<sub>máx</sub>) e a semivida terminal média de 4,4 dias (13). A eficácia clínica deste antibiótico foi demonstrada em ensaios clínicos de campo em bovinos e suínos (13). Porém, o índice farmacocinético/farmacodinâmico (PK/PD) que melhor se relaciona com a eficácia desta molécula permanece indefinido (79). Embora exista esta lacuna de informação, neste mesmo estudo, demonstrou-se pela primeira vez os índices PK/PD após injeção subcutânea de tildipirosina contra *Pasteurella multocida* em ratos com infecção pulmonar, sendo o índice de 0,25µg/ml *in vitro* (80). Além do mais, a MIC encontrada no soro foi 0,25 vezes menor que *in vitro* (80), esta diferença entre as MICs também ocorreu em estudo de Lei et al., (2018) em que a MIC de tildipirosina no plasma foi de 0,25 µg/mL (8 vezes menor do que no teste de sensibilidade a antimicrobiano *in vitro*) (79).

De modo geral, os macrolídeos caracterizam-se pela sua partição extensa nos tecidos. A tildipirosina concentra-se no pulmão e fluido brônquico, permanecendo ativo por dezessete dias (75). Em razão disto, o intervalo de segurança do medicamento em carne e vísceras ocorre aos nove dias após a sua administração em suínos (75). Este curto período de carência garante consequentemente maior segurança do seu uso em fase final de terminação (75).

Sugere-se que a metabolização da tildipirosina em suínos ocorre pela redução e conjugação sulfato com subsequente hidratação (ou abertura do anel), por desmetilação,

desidroxilação e conjugação com N-cisteína e S-glutathione. A excreção total média da dose administrada em 14 dias é cerca de 17% na urina e 57% através das fezes (13,75).

### 2.3.6 *Haemophilus parasuis* versus tildipirosina

Ainda existem poucas informações sobre os mecanismos moleculares de *H. parasuis* envolvidos na resistência à tildipirosina. Lei et al. (2017), através da abordagem transcriptômica, compararam a variação gênica de cepas de *H. parasuis* JS0135 (sensível) e JS32 (resistência induzida) a tildipirosina. Com o perfil de expressão dos principais genes ativados ou repressados apresentaram pela primeira vez informações a nível genômico que podem elucidar os possíveis mecanismos de resistência do *H. parasuis* a tildipirosina. Os principais genes sobre-expressados durante o estímulo *in vitro* de *H. parasuis* com tildipirosina estão compilados na tabela 3 (81).

No presente trabalho objetivou-se a avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas clínicas de *H. parasuis* proveniente de suínos com sintomas da DG frente ao macrolídeo TIP.

**Tabela 3.** Perfil de expressão gênica relacionada a regulação positiva de genes de *H. parasuis* relacionados a resistência a tildipirosina.

<b>Regulação positiva de genes</b>	
<i>Genes/funções</i>	<i>Produto</i>
<b>Via metabólica: Super-expressão de:</b>	
<i>HAPS_RS09315</i>	Endonuclease restrição da subunidade M
<i>HAPS_RS09320</i>	DNA citosina metiltransferase
<i>HAPS_RS08950</i>	tiamina fosfato sintase
<i>HAPS_RS08955</i>	hidroximetilpirimidina cinase/fosfometilpirimidina quinase
<b>CAMP Resistente:</b>	
<i>HAPS_RS07240</i>	proteína hipotética
<i>HAPS_RS11325</i>	proteína contendo o domínio de ligação ao cálcio
<i>HAPS_RS06175</i>	Acil
<b>Ribossomo:</b>	
<i>HAPS_RS07815</i>	Proteína ribossômica L16 50S
<i>HAPS_RS07810</i>	Proteína ribossômica S3 30S
<i>HAPS_RS07825</i>	Proteína ribossômica S17 30 S
<i>HAPS_RS07790</i>	Proteína ribossômica L23 50 S
<i>rpsJ</i>	Proteína ribossômica S10 30 S
<i>HAPS_RS0780</i>	Proteína ribossômica L22 50 S
<i>HAPS_RS07780</i>	Proteína ribossômica L3 50 S
<i>RplD</i>	Proteína ribossômica L4 50 S
<b>ABC transportadores:</b>	
<i>HAPS_RS10945</i>	Transportador ABC permease fosfanato
<i>HAPS_RS03625</i>	transportador ABC permease
<i>HAPS_RS05335</i>	proteína de membrana
<i>HAPS_RS03630</i>	Proteína de ligação ao ATP do transportador ABC
<i>HAPS_RS00315</i>	proteína hipotética
<i>HAPS_RS00310</i>	Proteína da família de transportadores ABC
<i>HAPS_RS05165</i>	subunidade de permease de transportador de arginina ArtQ

Fonte: Adaptada de LEI *et al.*, 2017.

### 3. CAPÍTULO 1

#### SHORT COMMUNICATION

#### **Atividade *in vitro* da tildipirosina contra cepas clínicas de *Haemophilus parasuis***

Priscila Rodrigues Peres<sup>1</sup>, Luiz Carlos Kreutz<sup>1</sup>, Rafael Frandoloso<sup>1\*</sup>

(O manuscrito será submetido a revista Research in Veterinary Science)

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo 99052-900, Brazil.

\* Autor correspondente: Rafael Frandoloso, [rfran@upf.br](mailto:rfran@upf.br)

## RESUMO

Tildipirosina é macrolídeo de última geração de uso veterinário utilizado para combater infecções produzidas por bactérias Gram negativas. Estudos recentes demonstraram a eficácia deste antibiótico contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*; no entanto, limitadas são as informações contra *Haemophilus parasuis*, agente etiológico da doença de Glässer. Neste estudo avaliamos a atividade antimicrobiana da tildipirosina contra 100 cepas clínicas de *H. parasuis* através do teste de microdiluição em caldo. Nossos resultados mostraram que 72% das cepas são susceptíveis a concentrações  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  de tildipirosina, e podem ser eficientemente controladas pela máxima concentração séria do produto após sua administração em suínos. Por outro lado, identificamos a presença de cepas clínicas resistentes a tildipirosina, com concentração inibitória mínima (CMI)  $> 32 \mu\text{g/ml}$ , gerando preocupação e ao mesmo tempo reforçando o uso da CMI para a vigilância da evolução de susceptibilidade e ou resistência de *H. parasuis* a tildipirosina bem como, para definir doses terapêuticas necessárias para controlar casos clínicos de doença de Glässer.

## TEXTO PRINCIPAL

A doença de Glässer (GD) é uma patologia inflamatória sistêmica que acomete leitões jovens, principalmente na fase de creche, e que produz importantes perdas econômicas para a indústria do suíno em razão da mortalidade dos animais afetados e dos altos custos decorrentes do uso de antibióticos (Guizzo et al., 2018). A GD é causada pelo *Haemophilus parasuis* (Hps), uma bactéria Gram negativa que coloniza eficientemente o trato respiratório dos suínos já na primeira semana de vida (Cerdeira-Cuellar et al., 2010) juntamente com *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida*, todas bactérias pertencentes a família *Pasteurellaceae*.

A prevenção da GD é feita fundamentalmente através do uso de vacinas clássicas monovalentes e bivalentes (Guizzo et al., 2018). Estas vacinas são formuladas com sorovares de alta prevalência e distribuição mundial, e são capazes de induzir uma robusta resposta de anticorpos contra os polissacarídeos capsulares dos sorovares incluídos na vacina. Embora esta resposta seja interessante desde uma perspectiva de diagnóstico, ela não é desejável quando se almeja prevenção contra um patógeno fenotipicamente heterogêneo como é o caso do Hps. Esta limitação pode ser superada com o uso antígenos localizados na membrana externa da bactéria, fisicamente acessíveis aos BCRs dos linfócitos B e que desempenham funções biológicas importantes durante a patogênese da infecção. Neste particular, a proteína de união a transferrina B (TbpB) é na atualidade, o antígeno vacinal mais promissor para controlar a doença de Glässer (Barasuol et al., 2017; Frandoloso et al., 2015; Guizzo et al., 2018).

Hps, a longa data vem sendo classificado em 15 sorovares antigenicamente diferentes (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992); no entanto, recentemente, a partir de uma abordagem molecular, nosso grupo sugeriu a existência de no mínimo 9 novos sorovares, aumentando ainda mais a complexidade de se conseguir proteção heteróloga e com ampla cobertura contra Hps através do uso de vacinas clássicas (Espíndola, 2017).

Hoje, em razão dos constantes casos de GD, inclusive em granjas vacinadas com vacinas comerciais (Cleo Barbiero, veterinário de campo, informação pessoal), emerge a produção de vacinas autógenas e intensifica-se o uso de antimicrobianos não somente para tratar casos de GD, mas também, para prevenir a apresentação clínica da doença nas granjas.

Em relação aos antimicrobianos, entre as principais moléculas utilizadas para controlar o *H. parasuis* destacam-se os macrolídeos e, entre eles, Tiamulina, Tilosina, Lincomisina. O mecanismo de ação destas moléculas é muito parecido; consiste na inibição da síntese proteica bacteriana como consequência da sua união ao RNA ribossomal 23S presente na subunidade 50S (Chen et al., 2010). Nesse contexto, pesquisas de novas moléculas pertencentes a principal classe de antibiótico utilizado na suinocultura e efetivas contra *H. parasuis* é uma prioridade para manter os índices de produtividade de suínos, e por esta razão, neste estudo, determinamos o perfil de susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *H. parasuis* à tildipirosina, um macrolídeo de última geração de uso exclusivo veterinário.

Um total de 100 isolados clínicos de *H. parasuis* selecionados a partir da coleção de bactérias mantida pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada da Universidade de Passo Fundo foram incluídos neste estudo. As cepas foram isoladas entre janeiro de 2013 a junho de 2018 de suínos com clínica e lesões macroscópicas compatíveis com GD. Do total de cepas, 58 foram obtidas de sítios sistêmicos (articulação, peritônio, pericárdio e cérebro) e 42 a partir de pulmões, sendo cada isolado procedente de diferentes granjas e localizadas nas principais regiões de produção de suínos do país. Todas as cepas foram tipificadas molecularmente conforme descrito por Espíndola (2017). O teste de susceptibilidade foi conduzido por microdiluição em caldo utilizando placas de cultivo celular de 96 cavidades (TPP, Suíça) e seguindo as recomendações do CLSI (2013) para *A. pleuropneumoniae*. A tildipirosina foi fornecida pela Merck Sharp & Dohme (Brasil) na apresentação de produto comercial finalizado e denominado Zuprevo® (MSD, Brasil), o qual contém 4 mg/mL de

tildipirosina. O meio de cultivo do teste foi suplementado com 75µg/mL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma-Aldrich, USA) e 2.5 mg/mL de glicose (Sigma-Aldrich, USA).

As placas foram preparadas imediatamente antes do seu uso com diferentes concentrações de tildipirosina (0,032 – 256 µg), obtidas mediante diluição seriada (fator 2) utilizando PPLO como meio para diluição. Em cada placa foram incluídos 2 orifícios sem antibiótico os quais serviram de controle positivo de crescimento de *H. parasuis*, dois orifícios sem bactérias, os quais serviram de controle negativo de crescimento bacteriano. Em paralelo, os mesmos controles foram utilizados para analisar a cepa ATCC 27090 de *A. pleuropneumoniae*, a qual foi utilizada para validar cada placa utilizada no estudo. Um total de  $5 \times 10^4$  Hps foram adicionados por orifício da placa, os quais foram quantificados mediante citometria de fluxo conforme descrito por Miani et al. (2017). A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada como a menor concentração de tildipirosina capaz de inibir o crescimento bacteriano. Cada cepa foi analisada em duplicata na mesma placa.

Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana à tildipirosina de 100 cepas clínicas de *H. parasuis* estão representados na tabela 1. As CMIs de tildipirosina variaram de 0,03 a 128 µg/ml com valores de CMI<sub>50</sub> e CMI<sub>90</sub> de 0,25 e 32 µg/ml, respectivamente. Embora o valor da CMI<sub>90</sub> de tildipirosina tenha sido igual para todas as cepas, independentemente da origem das amostras, observamos que as cepas de origem pulmonar foram mais susceptíveis a tildipirosina, apresentado uma CMI<sub>50</sub> menor quando comparado com as amostras isoladas de sítios sistêmicos (0,12 vs 0,25 µg/ml, respectivamente). Estas diferenças podem ser explicadas pela extraordinária capacidade dos macrolídeos de se acumularem nos diferentes compartimentos do tecido pulmonar, bem como, de persistirem nos fluídos que recobrem as células epiteliais pulmonares (Berlin et al., 2017; Villarino et al., 2013). Estas características são ainda mais importantes quando se compara a tildipirosina com outros macrolídeos, pois ela



apresenta uma meia vida mais longa e mantem-se em concentrações mais altas no tecido pulmonar (Menge et al., 2012; Rose et al., 2013) do que no soro.

Quando analisamos a distribuição do perfil de susceptibilidade em relação ao ano de isolamento das cepas clínicas, observamos que todas as cepas com CIM maior que 8 µg/ml (22%), levando em consideração o cut-off epidemiológico (COE) para tildipirosina descrito por Lei et al. (2018), foram isoladas a partir de 2015, ou seja, 1 ano após o início do uso da tildipirosina no país.

Na avaliação clínica de antibióticos, a relação entre a máxima concentração antimicrobiana no soro ( $C_{max}$ ) e a CMI definida *in vitro* é comumente utilizada como uma medida para determinar a eficiência *in vivo* de um tratamento. Neste cenário, a administração da dose terapêutica de tildipirosina pela via intramuscular em suínos (4 mg/Kg) rende uma  $C_{max}$  pulmonar de  $4,06 \pm 0,65$  µg/ml observada  $5,33 \pm 2,37$  h após sua administração (Lei et al., 2018). Considerando este valor, 72% das cepas analisadas neste estudo apresentaram  $CMI \leq 4$  µg/ml as quais poderiam ser eficientemente tratadas com o produto comercial Zuprevo<sup>®</sup> (MSD, Brasil) utilizado a dose terapêutica recomendada pelo fabricante.

Infelizmente, neste estudo, o histórico do uso da tildipirosina nas granjas das quais as cepas clínicas de *H. parasuis* foram isoladas não está disponível e, desta maneira, não é possível realizar nenhuma correlação entre os valores de CMIs e uso deste antibiótico. Conforme ilustrado na figura 1, 8 cepas clínicas apresentaram  $CMI \geq 64$  (n=2) e  $\leq 128$  (n=6) µg/ml, valores muito acima do COE, o que sugere a circulação de cepas já resistentes a este antibiótico, como já relatado na China (Lei et al., 2018).

O mecanismo de ação da tildipirosina consiste na inibição da síntese proteica bacteriana como consequência da sua união ao RNA ribossomal 23S presente na subunidade 50S (Chen et al., 2010). De maneira adaptativa, as lincosamidas desenvolveram um mecanismo de resistência baseado na alteração do sitio alvo de ação do antibiótico, produzindo inclusive

resistências cruzadas entre macrolídeos ou mesmo, entre lincosamidas e streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) (Roberts, 2008). Nesta mesma linha, Aller-Moran et al. (2015) demonstrou resistência cruzada entre tiamulina e valnemulina e Pringle et al. (2004) entre lincomicina e tilosina.

Ainda, Chen et al. (2010) demonstraram a presença do gene de inativação de lincosamina *lnu(C)* em plasmídeos extra-cromossomais isolados de cepas clínicas de *H. parasuis*. Este descobrimento contribui para o entendimento evolutivo da disseminação de resistência a lincomicina entre ou através de espécies bacterianas Gram negativas.

Interessantemente, no Brasil, reportamos recentemente a circulação de cepas clínicas de *H. parasuis* altamente resistentes a lincomicina e tiamulina (Miani et al., 2017) e, em razão da possibilidade de resistência cruzada entre macrolídeos, poderia ser esta uma explicação lógica para entender a presença de cepas resistentes a tildipirosina no Brasil. Futuras investigações precisam ser realizadas para estudar o processo evolutivo de resistência de *H. parasuis* a tildipirosina em regiões com alta resistência a lincomicina.

Em conclusão, nossos resultados indicam que tildipirosina pode ser recomendada para o tratamento clínico de suínos com doença de Glässer, no entanto, em razão da presença de cepas já resistentes ao antibiótico, o teste de CMI deve ser periodicamente utilizado para (i) determinar a dose terapêutica e (ii) monitorar a evolução de resistência de *H. parasuis* a tildipirosina.

## **CONFLITO DE INTERESSE**

Nenhum dos autores deste manuscrito possui qualquer interesse econômico ou pessoal com outras pessoas ou organizações públicas ou privadas que possa influenciar nos resultados deste manuscrito.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Letícia Gressler por sua excelente colaboração no desenho deste estudo. Este trabalho foi financiado pela Secretária de Desenvolvimento Econômico Ciência e Tecnologia (Convênio 46/2014, processo 328-25.00/14-0) e Merck Sharp & Dohme.

## REFERÊNCIAS

- Aller-Moran, L.M., Martinez-Lobo, F.J., Rubio, P., Carvajal, A., 2015. Evaluation of the in vitro activity of flumequine against field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Research in veterinary science* 103, 51-53.
- Barasuol, B.M., Guizzo, J.A., Fegan, J.E., Martinez-Martinez, S., Rodriguez-Ferri, E.F., Gutierrez-Martin, C.B., Kreutz, L.C., Schryvers, A.B., Frandoloso, R., 2017. New insights about functional and cross-reactive properties of antibodies generated against recombinant TbpBs of *Haemophilus parasuis*. *Sci Rep* 7, 10377.
- Berlin, S., Randow, T., Scheuch, E., Grube, M., Venner, M., Siegmund, W., 2017. Pharmacokinetics and pulmonary distribution of gamithromycin after intravenous administration in foals. *J Vet Pharmacol Ther* 40, 406-410.
- Cerda-Cuellar, M., Naranjo, J.F., Verge, A., Nofrarias, M., Cortey, M., Olvera, A., Segales, J., Aragon, V., 2010. Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis*. *Veterinary microbiology* 145, 315-320.
- Chen, L.P., Cai, X.W., Wang, X.R., Zhou, X.L., Wu, D.F., Xu, X.J., Chen, H.C., 2010. Characterization of plasmid-mediated lincosamide resistance in a field isolate of *Haemophilus parasuis*. *J Antimicrob Chemother* 65, 2256-2258.
- CLSI, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals — Fourth Edition: Approved Standard VET 01-A4 and VET01-S2. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.
- Espíndola, J.P., 2017. Determinação dos sorovares de *haemophilus parasuis* relacionados com a Doença de Glässer no Brasil, Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- Frandoloso, R., Martinez-Martinez, S., Calmettes, C., Fegan, J., Costa, E., Curran, D., Yu, R.H., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Ferri, E.F., Moraes, T.F., Schryvers, A.B., 2015. Nonbinding site-directed mutants of transferrin binding protein B exhibit enhanced immunogenicity and protective capabilities. *Infection and immunity* 83, 1030-1038.
- Guizzo, J.A., Chaudhuri, S., Prigol, S.R., Yu, R.H., Dazzi, C.C., Balbinott, N., Frandoloso, G.P., Kreutz, L.C., Frandoloso, R., Schryvers, A.B., 2018. The amino acid selected for generating mutant TbpB antigens defective in binding transferrin can compromise the in vivo protective capacity. *Sci Rep* 8, 7372.

- Kielstein, P., Rapp-Gabrielson, V.J., 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *Journal of clinical microbiology* 30, 862-865.
- Lei, Z., Liu, Q., Yang, B., Ahmed, S., Cao, J., He, Q., 2018. The pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and cut-off values of tildipirosin against *Haemophilus parasuis*. *Oncotarget* 9, 1673-1690.
- Menge, M., Rose, M., Bohland, C., Zschiesche, E., Kilp, S., Metz, W., Allan, M., Ropke, R., Nurnberger, M., 2012. Pharmacokinetics of tildipirosin in bovine plasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, nonanesthetized cattle). *J Vet Pharmacol Ther* 35, 550-559.
- Miani, M., Lorensen, M.S., Guizzo, J.A., Espíndola, J.P., Rodríguez-Ferri, E.F., Gutiérrez-Martín, C.B., Kreutz, L.C., Frandoloso, R., 2017. Antimicrobial susceptibility patterns of Brazilian *Haemophilus parasuis* field isolates. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37, 1187-1192.
- Pringle, M., Poehlsgaard, J., Vester, B., Long, K.S., 2004. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol Microbiol* 54, 1295-1306.
- Roberts, M.C., 2008. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS microbiology letters* 282, 147-159.
- Rose, M., Menge, M., Bohland, C., Zschiesche, E., Wilhelm, C., Kilp, S., Metz, W., Allan, M., Ropke, R., Nurnberger, M., 2013. Pharmacokinetics of tildipirosin in porcine plasma, lung tissue, and bronchial fluid and effects of test conditions on in vitro activity against reference strains and field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Pharmacol Ther* 36, 140-153.
- Villarino, N., Lesman, S., Fielder, A., Garcia-Tapia, D., Cox, S., Lucas, M., Robinson, J., Brown, S.A., Martin-Jimenez, T., 2013. Pulmonary pharmacokinetics of tulathromycin in swine. Part I: Lung homogenate in healthy pigs and pigs challenged intratracheally with lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *J Vet Pharmacol Ther* 36, 329-339.

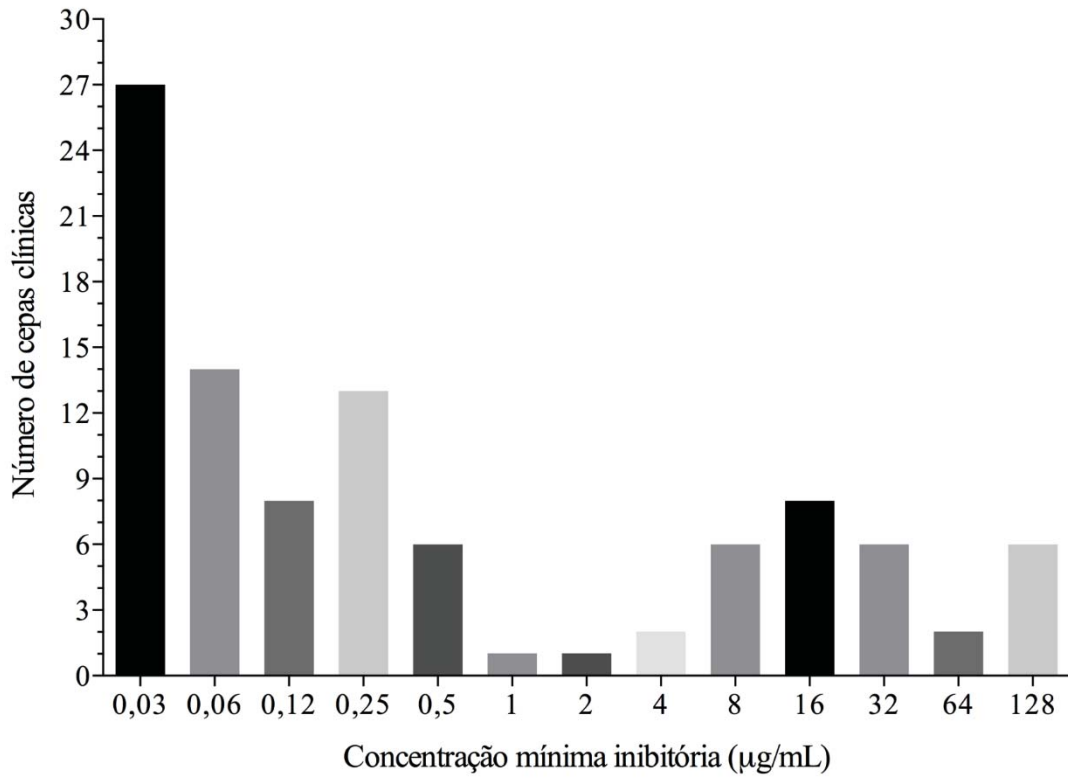
**Tabela 1.** Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) de Tildipirosina sobre cepas clínicas de *H. parasuis* isoladas de sítios sistêmicos e de origem pulmonar. CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram definidos como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% das cepas clínicas, respectivamente.

Cepas	Número de isolados com CIM (µg/ml)														CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
†	15	7	5	10	5	1	1	-	3	4	2	-	5	-	0,25	32
Δ	12	7	3	3	1	-	-	2	3	4	4	2	1	-	0,12	32
Total	27	14	8	13	6	1	1	2	6	8	6	2	6	-	0,25	32

†: Isolados sistêmicos de *Haemophilus parasuis* (n=58);

Δ: isolados pulmonares de *H. parasuis* (n=42).

**Figura 1.** Distribuição da CMI's de Tildipirosina para 100 isolados clínicos de *H. parasuis*.



## 4. CONCLUSÕES

### Primeira

A tildipirosina é um macrolídeo de última geração altamente efetivo contra cepas de *H. parasuis* isoladas de casos de doença de Glässer no Brasil. Este antibiótico apresenta-se como uma potente alternativa terapêutica para o tratamento de infecções respiratória causada por este patógeno.

### Segunda

As cepas clínicas de *H. parasuis* isoladas de sítios sistêmicos apresentaram um perfil de susceptibilidade a tildipirosina diferente das cepas isoladas do tecido pulmonar. Para as cepas sistêmicas, foi necessário utilizar o dobro da concentração do fármaco (CMI<sub>50</sub> = 0.25 µg/ml) para atingir os mesmos efeitos bacteriostáticos observados sobre as cepas pulmonares.

### Terceira

Embora a tildipirosina seja um antibiótico novo na suinocultura brasileira, já é possível observar a circulação de cepas de *H. parasuis* altamente resistentes (8%) a este macrolídeo. Conseqüentemente, a determinação da CMI torna-se fundamental para definir a dose terapêutica do produto bem como, para monitorar a evolução de resistência de *H. parasuis* a tildipirosina.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, o uso de antimicrobianos em animais de produção, e o desenvolvimento de resistência bacteriana tem chamado atenção das comunidades científicas nacionais e internacionais. O principal risco do uso descontrolado de antibióticos na produção animal consiste na transmissão de bactérias multirresistentes aos seres humanos, podendo a longo prazo produzir consequências irreparáveis, conforme destacou a Organização Mundial da Saúde no seu último alerta sobre o tema.

Em razão da importância deste tema, muitos países europeus há muito tempo iniciaram a redução ou banimento total do uso de antibióticos como promotores de crescimento animal, entre eles, destacam-se a Inglaterra (proibiu o uso de clotetraciclina em 1969) e a Dinamarca (baniu o uso de antibióticos em 2000). Hoje, os 28 membros da União Europeia seguem a mesma orientação em relação ao uso de antibióticos na produção de qualquer animal destinado ao consumo humano. Seguindo o mesmo caminho, os Estados Unidos e Canadá também iniciaram um plano nacional para banir ao longo dos próximos anos o uso de qualquer antibiótico utilizado como medida quimio-preventiva na produção animal. Atualmente, 8 antimicrobianos já passaram a ser proibidos em razão de pertencerem a classes comuns de antibióticos utilizado para tratar infecções que acometem humanos. De forma geral, os países produtores e exportadores de carne suína estão estabelecendo medidas para minimizar ou desacelerar o desenvolvimento de resistência em bactérias e garantir o futuro da espécie humana.

O Brasil ocupa um lugar de destaque entre os principais produtores de proteína animal no mundo. Hoje, somos o principal país produtor de carne bovina, 2º em produção de aves e o 4º maior produtor e exportador de carne suína. Em conjunto, o sistema de produção animal brasileiro pode expandir significativamente nos próximos anos e aumentar assim sua participação no mercado internacional. Para isso, precisaremos cumprir os requisitos que serão impostos pelos países importadores quanto ao uso de antimicrobianos na produção animal, e esse, será o grande desafio a ser superado nos próximos anos.

Pensando neste cenário, já atual, em 2017 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou o “Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos”, o qual está em desenvolvimento e prevê o estabelecimento de medidas regulatórias quanto ao uso de antibióticos na produção de suínos, tendo como base a realidade



brasileira e a experiência de países com planos já em ação bem como, atendendo as exigências das principais agências internacionais, como OMS, OIE, FAO e *Codex Alimentarius*. Embora exista um plano nacional, atualmente, a suinocultura brasileira é totalmente livre para utilizar todas as moléculas antimicrobianas existentes de acordo com os protocolos estabelecidos pelos Médicos Veterinários especialistas em suínos.

Em razão do intenso uso de antibióticos nas diferentes fases de produção dos suínos (creche até a terminação), temos observados (experiência do nosso laboratório) a presença de cepas de *Haemophilus parasuis* isoladas de casos clínicos de doença de Glässer (GD) multi-resistentes aos principais antimicrobianos utilizados na suinocultura, o que resulta numa situação muito preocupante. Nesse horizonte, estudos de eficácia de novas moléculas antibióticas sobre cepas clínicas de *H. parasuis* são necessários de modo a encontrar moléculas que podem ser potencialmente utilizadas para tratar a GD.

Neste estudo, pioneiro no Brasil, demonstramos a eficácia *in vitro* da tildipirosina contra 100 cepas de *H. parasuis* isoladas de suínos com sintomas de doença de Glässer procedentes de granjas localizadas nas principais regiões produtoras de suínos do país. A Tildipirosina é um macrolídeo de uma geração introduzido no Brasil em 2015, pela MSD (Brazil) e de uso exclusivo veterinário. Esta característica é extremamente importante pois atende aos requisitos estabelecidos pela OMS e pela OIE com relação aos macrolídeos, os quais estão na lista das três classes de antimicrobianos considerados de prioridade máxima para o desenvolvimento de medidas e estratégias de redução de uso na medicina veterinária, em razão de serem muito utilizados em medicina humana.

Portanto, o conhecimento do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *H. parasuis* a tildipirosina visa assegurar o tratamento da doença de Glässer com segurança, eficácia e qualidade. Nossos resultados demonstram que este antibiótico possui elevada eficácia contra *H. parasuis*, no entanto, já observam-se a circulação de algumas cepas altamente resistentes à esta molécula, o que gera preocupação e, ao mesmo tempo, reforça a necessidade de se utilizar rotineiramente o teste de concentração inibitória mínima para monitorar a evolução de resistência de *H. parasuis* a tildipirosina. Atendendo assim aos anseios do “Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos”.

Por fim, futuros estudos precisam ser realizados para entender como as cepas de *H. parasuis* brasileiras desenvolveram resistência a tildipirosina, fundamentalmente para descobrir se esta resistência está relacionada com a presença de plasmídeos carreadores de genes de resistência, os quais poderiam facilmente transmitir este perfil de resistência não somente entre

cepas de *H. parasuis*, mas também a outros gêneros bacterianos pertencentes a família *Pasteurellaceae*.

## REFERÊNCIAS

1. Holtkamp et al. 2007. SwineNews newsletter, Vol 30, N 03
2. Zanella JRC, Morés N, Neves de Barcellos DSN. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.51, n.5, p.443-453, 2016.
3. Barcellos DESN, Marques BMFPP, Moraes TJ, Coelho CF, Borowski SM. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos na suinocultura. Acta Scientiae Veterinariae. 37 (Supl 1): s151-155, 2009.
4. DANMAP 2013. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. ISSN 1600-2032
5. Martin, M.J., Thottathil, S.E. & Newman, T.B. Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. Am J Public Health 105, 2409-2410 (2015).
6. Antimicrobial resistance. Disponível em <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 20/09/2018.
7. Pereira, A. L.; Fontes, S. C. I.; Fostier, H. A.; Rath, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. Quim. Nova, vol. 35, No. 1, 159-169, 2012.
8. Miani M, Lorenson MS, Guizzo JA, Espíndola J, Rodríguez-Ferri EF, Gutiérrez-Martín CB, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of Brazilian Haemophilus parasuis field isolates. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2017.
9. OMS. Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos. Noviembre de 2017.
10. CLSI. Performance Standards for antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard- Fourth Edition. CSLI dociment VET 01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
11. Schwarz, S., Böttner, A., Hafez, H. M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Richter, A., Traeder, W., Waldmann, K.-H., Wallmann, J., Werck-enthin, C., 2003, Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: methods for in vitro susceptibility testing and their suitability with regard to the generation of the most useful data for therapeutic applications [in German, with English abstract]. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.116, 353-361
12. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. Brasília. 2017.
13. EMA (2018). Zuprevo. Anexo 1. Resumo das características do medicamento. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/ema/> Acesso em:20/05/2018.
14. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of new Haemophilus species. J Med Microbiol. 1969; 2(1):75-8.
15. Little TW. Haemophilus infection. The Veterinary Records, v.87, p. 3999-402, 1970.
16. Abipcs. Relatório Abipcs 2012. 2012.
17. Animal ABPA. Relatório Anual 2017. 2017.

18. IBGE. Estatística de Produção Pecuária. Disponível em: < <https://ww2.ibge.gov.br/>>. Acesso em 02/04/2018.
19. Nicolet J. Haemophilus parasuis. Diseases of swine. 1992; 7:526-8.
20. Menin, A, Gava D, Vaz EK. Aspectos gerais sobre a infecção por Haemophilus parasuis em suínos: revisão. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.4. n.2, p. 148-156, 2005.
21. Kielstein P, Rosner H, Muller W. Typing of heat-stable soluble Haemophilus parasuis antigen by means of agargel precipitation and the dot-blot procedure. Zentralbl Veterinarmed B. 1991;38(4):315-20.
22. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. Prevalence of Haemophilus parasuis serovars among isolates from swine. Am J Vet Res. 1992;53(5):659-64.
23. Del Río ML. et al. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping Haemophilus parasuis. Journal Clinical Microbiology, v.41, n.2, p.880-882, 2003.
24. Tadjine M. et al. Development of a serological test for serotyping Haemophilus parasuis isolates and determination of their prevalence in North America. Journal Clinical Microbiology, v.24, n.2, p.839-840, 2004
25. Turni C, Blacka PJ. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping Haemophilus parasuis. Vet Microbiol, v. 106, p. 145-51, 2005.
26. Macedo NR, Oliveira SR, Lage AP, Guedes RM. v.188, Epidemiologia molecular de Haemophilus parasuis. Ciência rural, Santa Maria, v.39, p.2576-2582, 2009.
27. Lorenson MS, Miami M, Guizzo JÁ, Barasuol B, Martínez-Martínez S, Ferri EFR, et al. Altered indirect hemagglutination method for easy serotyping of Haemophilus parasuis. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.69, n.1, p.15-21, 2017
28. Espíndola, P. J. Determinação dos sorovares de Haemophilus parasuis relacionados com a doença de Glasser no Brasil. 2017. 51f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação)- Universidade de Passo Fundo. Rio Grande do Sul.
29. Santos JL. Epidemiologia e controle da infecção por Haemophilus parasuis. 1997.
30. Macedo NR, Oliveira SR, Lage AP, Santos JL, Araujo MR, Guedes RM. ERIC-PCR genotyping of Haemophilus parasuis isolates from Brazilian pigs. Journal veterinary, v.188, n.3, p.362-4, 2011.
31. Moreno LZ, Castilha KS, de Gobbi DD, Coutinho TA, Ferreira TS, Moreno AM. ERIC-PCR genotypic characterization of Haemophilus parasuis isolatd from Braziliium swine. Braz J Microbiol. 2011;42(4):1420-6.
32. Aragon V, Cerdà-Cuéllar M, Fraile L, Mombarg M, Nofrarías M, Olvera, A, Sibila M. Solanesa D, Segalés J. Correlation between clinicopathological outcome and typing of Haemophilus parasuis field strains. Veterinary microbiology, v. 142, n. 3, p. 387-393, 2010.
33. Oliveira S, Pijon C. Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet. Microbiol. 2004.
34. Schwartz, K.J. Manual de enfermedades del porcino, Suis. 2005
35. Costa-Hurtado M, Aragon V. Advances in the quest for virulence factors of Haemophilus parasuis. The Veterinary Journal, v. 198, n. 3, p. 571-576, 2013.
36. Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Experimental reproduction of Haemophilus parasuis infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. J Vet Diagn Invest. 1995;7(4):476-80.
37. Frandoloso R, Martinez S, Rodrigues-Ferri EF, Garcia-Iglesias MJ, Perez-martinez C, Martinez-fernande B, et al. Development and characterization of protective Haemophilus parasuis subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin and comparison with other subunit and commercial vaccines. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(1):50-8.

38. Frandoloso R, Pivato M, Martínez-Martínez S, Rodríguez-ferri EF, Kreutz LC, Martín CB. Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of AOC-45 porcine aorta endothelial cell. *BMC Veterinary Research* 2013, 9:207.
39. Mullins MA, Register KB, Bayles DO Butler JE. *Haemophilus parasuis* exhibits IgA protease activity but lacks homologs of the IgA protease genes of *Haemophilus influenzae*. *Veterinary Microbiology*, v. 153, p. 407–412, 2011.
40. Olvera A, Ballester M, Nofrarias M, Sibila M, Aragon V. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. *Veterinary research*, v. 40, n. 3, p. 1-12, 2009
41. Bouchet B, Vanier G, Jacques M, Auger E, Gottschalk M. Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release. *Microbial pathogenesis*, v. 46, n. 2, p. 108-113, 2009.
42. kaar EP (2010) The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Pathog* 6(8): e1000949. doi:10.1371/journal.ppat.1000949.
43. Xie Q, Jin H, Leo R, Wan Y, Chu J, Zhou H, Shi B, Chen H, Zhou R. Transcriptional responses of *Haemophilus parasuis* to iron- restriction stress in vitro. *BioMetals* 22, 907-916, 2009.
44. Frandoloso R, Martínez-Martínez S, Calmettes C, Fegan J, Costa E, Curran D, Yu R., Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Ferri EF, Moraes TF, Scryvers AB. 2015. Nonbinding site-directed mutants of transferrin binding protein B exhibit enhanced immunogenicity and protective capabilities. *Infect Immun* 83:1030-1038. doi:10.1128/IAI.02672-14.
45. Sobestiansky, J. et al. *Clínica e patologia suína*. 2. Ed. Goiânia, 2001.
46. Barcellos DESN, Marques BMFPP, Moraes TJ, Coelho CF, Borowski SM. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos na suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37 (Supl 1): s151-155, 2009.
47. Díaz-Cruz MS, De Alba MJL, & Barceló D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 22:340-351, 2003.
48. Regitano JB, Leal RMP. Comportamento e Impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal Brasileira. *R. Bras. Ci. Solo*, 34:601-616, 2010.
49. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente. 2016.
50. de la Fuente AJ, Tucker AW, Navas J, Blanco M, Morris SJ, Gutierrez-Martin CB. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary microbiology*. 2007;120(1-2):184-91.
51. Brogden S, Pavlović A, Tegeler R, Kaspar H, De Vaan N, Kehrenberg C, Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* isolates from Germany by use of a proposed standard method for harmonized testing, *Veterinary Microbiology* (2010), <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.017>
52. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Angen O. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet Microbiol*. 2004;101(2):143-6.
53. Dayao DA, Kienzle M, Gibson JS, Blackall PJ, Turni C. Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol*. 2014;172(3-4):586-9.
54. Xu C, Zhang J, Zhao Z, Guo L, Zhang B, Feng S, Zhang L, Liao M. Antimicrobial Susceptibility and PFGE Genotyping of *Haemophilus parasuis* Isolates from pigs in South China (2008-2010). *J. Vet. Med. Sci*. 73(8):1061-1065, 2011.
55. Zhou X, Xu X, Zhao Y, Chen P, Zhang X, Chen H, Cai X. 2010. Distribution of antimicrobial resistance among diferentes serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet Microbiol* 141:168-173.

56. Nedbalcová K, Kučerová Z. 2013. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. *Acta Veterinaria Brno* 82:3-7
57. Millan AS, Escudeiro JÁ, Catalan A, Nieto S, Farelo F, Gibert M, Moreno MA, Dominguez L, Gonçalves-Zorn B.  $\beta$ -lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is Mediated by plasmid Pb1000 Bearing bla<sub>ROB-1</sub>. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, vol.51, n.6. 2007.
58. Zhao et al. (2018), Chacacterization of antimicrobial resistance genes in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in China. *PeerJ* e4613; DOI10.7717/peerj.4613.
59. Farmacologia. Rang, H.P.; Dale, M.M. Editora Elsevier, 8ª edição, 2016.
60. Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária. Steeve Giguère, John F. Prescott, J. Desmond Baggot, Robert D. Walker, Patricia M. Dowling Editora Roca, 4ª edição, 2010.
61. Guardabassi, L.; Jensen, L. B.; Kruse, H. Guia de antimicrobianos em veterinária. Porto Alegre: Artmed, 2010.
62. OMS. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistència a los antimicrobianos. 27 de marzo de 2015.
63. Zhang Q, Zhou M, Sang D, Zhao J, Zhang A, Jin M. Molecular characterization of resistance to fluorquinolones in *Haemophilus parasuis* isolated from China. *International Journal of Antimicrobial Agents* 42 (2013) 87-89.
64. Vaz E.K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. *Acta Scientiae Veterinarie*. 37 (Supl 1): s147-s150, 2009.
65. Boxall, A. B. A.; Kolpin, D. W.; Halling-Sørensen, B. H.; Tolls, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.*, 37: 286A294A, 2003.
66. Kunz, A.; Higarashi, M. M.; De Oliveira, P. M. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 22, n. 3, p. 651-665, set/dez.2005.
67. Hamscher, G.; Pawelzick, H.T.; Hoper, H. & NAU, H. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24:861-868, 2005.
68. Kinney, C. A.; Furlong, E. T.; Kolpin, D. W.; Burkhardt, M. R.; Zaugg, S. D.; Werner, S.L.; Bossio, J. P.; Benotti, M. J.; Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 1863.
69. Boonsaner M, Hawker D. W. Transfer of oxytetracycline from swine manure to three different aquatic plants: Implications for human exposure. *Chemosphere* 122 (2015) 176-182.
70. OIE. World Organisation for Animal Health. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Maio, 2015.
71. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em < [www.agricultura.gov.br/](http://www.agricultura.gov.br/)>. Acesso: 31/05/2018.
72. OMS. Organização Mundial de Saúde. Lista OMS de AIC, 5ª revisão : <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>. Acesso:31/05/2018.
73. Poehlsgaard J, Andersen NM, Warrass R, Douthwaite S. 2012. Visualizing the 16-membered ring macrolides tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site. *ACS Chem. Biol.* 7:1351–1355.
74. Marosevic, D., Kaevska M., Jaglic Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage- a review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2017, vol.24, no 2, 338-344.
75. MSD Animal Health. Zuprevo 40 mg/ml solución inyectable para porcino. Disponível em [http://www.msd-animal-health.es/products/porcino/antibiotico\\_inyectable.aspx](http://www.msd-animal-health.es/products/porcino/antibiotico_inyectable.aspx) Acesso em 20/05/2018.

76. Andersen MN, Poehlsgaard J, Warrass, Douthwaite S. Inhibition of protein synthesis on the ribosome by tildipirosin compared with other veterinary macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.p.6033-6036. 2012.
77. Hansen JL. Et al.2002. The structures of four macrolide antibiotic bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* 10:117-118.
78. Liu M, Douthwaite S. 2002. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methaylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:14658-14663.
79. Lei. Z, Liu. Q, Yang. B, Ahmed. S, Cao. J, He. Q. The pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and cut-off values of tildipirosin against *Haemophilus parasuis*. *Oncotarget*, 2018, Vol.9 (No.2), pp:1673-1690.
80. Zeng D, Sun M, Lin Z, Li M, Gehring R and Zeng Z (2018) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tildipirosin Against *Pasteurella multocida* in a Murine Lung Infection Model. *Front. Microbiol.* 9:1038. doi: 10.3389/fmicb.2018.01038
81. Lei. Z, Fu. S, Yang. B, Liu. Q, Ahmed, S. Xu. L, Xioung. J, Cao. J, Qiu. Y. Comparative transcriptional profiling of tildipirosin-resistant and sensitive *Haemophilus parasuis*. *Scientific Reports* 7:7517, 2017.