

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

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DA  
INFECÇÃO POR *Haemophilus parasuis* SOROVAR 7 CEPA 174 EM  
LEITÕES PRIVADOS DE COLOSTRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CLÁUDIA CERUTTI DAZZI**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2018**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR  
*HAEMOPHILUS PARASUIS* SOROVAR 7 CEPA 174 EM LEITÕES PRIVADOS DE  
COLOSTRO**

**Cláudia Cerutti Dazzi**

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 **Mestra em Bioexperimentação**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz**

**Passo Fundo, RS, Brasil**

**2018**

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

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

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E ANATOMOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR  
*HAEMOPHILUS PARASUIS* SOROVAR 7 CEPA 174 EM LEITÕES PRIVADOS DE  
COLOSTRO**

Elaborada por  
**Cláudia Cerutti Dazzi**

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

**Comissão Examinadora**

  
**Luiz Carlos Kneutz, Dr., UPF  
(Orientador/Presidente)**

  
**Rafael Frandoloso, Dr., UPF**

  
**Marcelo Weiss, Dr., IMED**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2018**

CIP – Catalogação na Publicação

---

D277c Dazzi, Cláudia Cerutti

Caracterização clínica e anatomopatológica da infecção por *Haemophilus parasuis* sorovar 7 cepa 174 em leitões privados de colostro / Cláudia Cerutti Dazzi. – 2018.

51 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz.

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

1. Suíno - Doenças. 2. Doença de Glässer. 3. Patologia veterinária. 4. Diagnóstico bacteriológico. I. Kreutz, Luiz Carlos, orientador. II. Título.

CDU: 636.4.09

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, pelo suporte, por sempre acreditarem em mim e doarem-se às nossas causas, por sempre termos uns aos outros e contarmos com todos. Meu amor por vocês é inexplicável e a sensação de poder contar uns com os outros a qualquer momento... indescritível. Sou uma pessoa de sorte por tê-los em minha vida. “You for me, me for you”.

Em um segundo momento, agradeço ao programa de mestrado Bioexperimentação, por permitir que continuemos nossos estudos em nossa casa, a Universidade de Passo Fundo. Aqui me formei e aprendi tudo que sei profissionalmente, até este momento. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas, sem a qual nada disso seria possível em minha caminhada.

Gostaria de agradecer igualmente aos professores Luiz Carlos Kreutz e Rafael Frandoloso, por abrirem suas portas e me propiciarem a oportunidade de trabalhar com seu grupo de pesquisa. Meu mais sincero agradecimento não apenas por esta oportunidade, mas por vocês terem acreditado em mim, em minha capacidade e em me fazerem enxergar o futuro com outros olhos, mesmo quando eu não o consegui fazê-lo. Obrigada pelo suporte, obrigada pela confiança, obrigada por tudo! De coração. Vocês são pesquisadores fantásticos, mas acima de tudo, grandes seres humanos e lhes tenho como exemplo profissional e, principalmente, de vida. Pois de nada adiantaria grandes conquistas, se pusermos nossa humanidade de lado.

Agradecer também às amigas e companheiros de jornada que fiz nestes dois anos de caminhada, que em momentos felizes, outros nem tanto, em meio a experimentos ou uma simples conversa, sempre estiveram lá. Estes amigos/colegas chamam-se João, Simone, Lucas, Rafaela, Gabriela, Marcelo e Karina. Que o caminho de vocês seja iluminado, cheio de conquistas e sucesso, vocês merecem.

Agradecer também quem me deu oportunidade na iniciação científica, como a Professora Maria Isabel Botelho Vieira e a Professora Adriana Costa da Motta. Obrigada às duas, mas principalmente à Profa. Adriana, por me apresentar o “mundo da patologia”, que amo e que escolhi como caminho profissional.

E, finalmente, à Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT, processo número 328–2500/14-0) do estado do Rio Grande do Sul pelo aporte financeiro aos projetos do Laboratório, com o qual foi possível a realização deste experimento.

**EPIGRAFE**

*“I like things to happen, and if they don’t happen I like to make them happen.”*

Sir. Winston Churchill

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1. <i>Haemophilus parasuis</i> .....	16
2.2. A Doença de Glässer .....	17
2.2.1. Etiologia .....	18
2.2.2. Patogenia .....	18
2.2.3. Sinais Clínicos .....	19
2.2.4. Lesões Macroscópicas .....	19
2.2.5. Lesões Microscópicas .....	20
2.2.6. Diagnóstico .....	21
2.2.7. Tratamento e Prevenção .....	21
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	23
Clinical and pathological characterization of <i>Haemophilus parasuis</i> strain 174 in pigs .....	23
Abstract .....	24
Introduction .....	25
Materials and methods .....	26
<i>H. parasuis</i> strain and growth condition .....	26
Pig experimental infection and clinical evaluation .....	26
Necropsy and sampling .....	27
Sampling growth and Molecular detection .....	27
Histology .....	28
Ethics statement .....	28
Results .....	28
Discussion .....	31
Conclusions .....	34
References .....	35
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	45
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

## LISTA DE FIGURAS

### 3. CAPÍTULO 1

- FIGURE 1. Clinical evolution representation indicated by temperature versus days post challenge (dpc). The red dot line represents the fever limit line (39.6°C)..... 40
- FIGURE 2. Meningitis (A and B), polyarthritis (G) and polyserositis (E, F and H) caused by *Haemophilus parasuis* SV7 strain 174. Detail to prominent meningitis in cerebellum (B). Corneal opacity (C) associated with congestion of optical nerve (D) in endophthalmitis cases..... 41
- FIGURE 3. A) Fibrinosuppurative meningitis with perivascular cuffing. H&E, 50x. B) Intense hemorrhage in cerebellar subarachnoid space, with fibrinosuppurative deposition above medulla oblongata. H&E, 50x. C) Fibrinosuppurative endophthalmitis of the anterior chamber, with content attached to the internal cornea. H&E, 50x. D) Optical nerve, from left to right, hemorrhage; fibrinosuppurative perineuritis; optical nerve itself, there is a distention of neural sub-arachnoid space, by inflammatory content. H&E, 200x. E) Fibrinosuppurative pericarditis with inflammatory spread through heart layers until myocardium. H&E, 50x. F) Fibrinosuppurative pleuritis, with septal distension by the same infiltrate, associated with bronchointerstitial pneumonia and intense vascular congestion. H&E, 50x. G) Fibrinosuppurative arthritis. H&E, 50x. H) Fibrinosuppurative peritonitis. H&E, 50x.)..... 42
- FIGURE 4. Thymus, cortical zone from the *H. parasuis*, strain 174 intratracheal infected colostrum-deprived swine. There is a marked lymphoid depletion, with thin and delicate basophilic material deposition amongst cells that resembles fibrin strings. There are multiple macrophages, and vessel congestion. At the left lower corner there is distention of the interlobular space, filled with fibrin resemblance material amongst inflammatory cells. H&E, 400x..... 43



**LISTA DE TABELAS****3. CAPÍTULO 1**

TABLE 1. Main pathological findings and intensity according to day of death post-challenge.....	38
-------------------------------------------------------------------------------------------------	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Mm	Micrometro
MI	Microlitro
Ac	Anticorpo
SC	Sistema do Complemento
DG	Doença de Glässer
<i>Hps</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>
PAMs	Macrófagos alveolares
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
Omp	Proteína de membrana externa
PBS	Solução salina fosfatada
pTf	Transferrina suína
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
p.e.	Por exemplo
SV	Sorovar
TbpB	Proteína de união à transferrina B

## RESUMO

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

### **CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E PATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Haemophilus parasuis* SOROVAR 7 CEPA 174 EM LEITÕES PRIVADOS DE COLOSTRO**

Autor: Cláudia Cerutti Dazzi

Orientador: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 31 de julho de 2018

O *Haemophilus parasuis* é um cocobacilo gram negativo pertencente à família *Pasteurellaceae* e causador da Doença de Glässer, a qual se caracteriza pela deposição de material fibrinoso a fibrinossupurativo em articulações, serosas e meninges. Até o momento, existem 15 sorovares (SV) tipificados deste microrganismo, classificados em altamente e moderadamente virulentos, e avirulentos. Dentre os sorovares considerados avirulentos ou de baixíssima virulência está o sorovar 7, cepa de referência 174. Este sorovar é assim classificado desde o ano de 1992; entretanto, estudos recentes demonstram um aumento na prevalência do SV7 não somente no pulmão, mas também em outros sítios como articulações, em suínos acometidos pela Doença de Glässer. Estes fatos nos instigaram a crer que o SV7 é virulento e capaz de desencadear a Doença de Glässer. Para comprovar essa hipótese e a virulência do SV7, vinte leitões privados de colostro foram desafiados intratraquealmente com  $1 \times 10^7$  *Haemophilus parasuis* SV7 cepa 174 e avaliados clinicamente a cada 24 horas. Animais infectados apresentaram sinais clínicos condizentes com a Doença de Glässer. Em menos de 24h um animal morreu por choque séptico. Após 24h, os animais apresentaram febre acima de 40°C, associada, primeiramente, com artrite, seguido de sinais respiratórios. Conforme a evolução do quadro, no segundo e terceiro dias, os animais apresentavam sinais neurológicos associados à artrite e dispnéia. Nenhum animal sobreviveu ao quinto dia pós-infecção. Todos os suínos infectados foram necropsiados para coleta de material biológico visando o isolamento do SV7 e avaliação das lesões macro e microscópicas. O *H. parasuis* foi recuperado após semeadura do material biológico em ágar chocolate seguido da confirmação do SV7 por meio de PCR multiplex. Os principais achados macroscópicos foram poliartrite, poliserosites e meningite, lesões clássicas da Doença de Glässer. Microscopicamente estas lesões constituíam-se de infiltrado de neutrófilos e macrófagos em meio a uma rede de fibrina (infiltrado fibrinossupurativo), associado a alguns linfócitos. Além disso, foi observada aplasia tímica e endoftalmite fibrinossupurativa. Pela análise dos achados anatomopatológicos, observamos a possibilidade de o *H. parasuis* ultrapassar barreiras hematógenas em diferentes órgãos como, cérebro, olho e timo. Lesões oculares nunca antes descritas para a Doença de Glässer foram observadas em diversos animais e se caracterizaram por endoftalmite e perineurite do nervo ocular. Com esse estudo concluímos que o SV7, cepa 174, é capaz de causar a Doença de Glässer em suínos altamente susceptíveis, promovendo um curso clínico letal, e que a classificação deste SV deveria passar de avirulento para virulento.

**Palavras-chave:** Doença de Glässer; Sorovar 7; clínica; patologia.

**ABSTRACT**

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

**CLINICAL AND PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Haemophilus parasuis* INFECTION SEROVAR 7 STRAIN 174 IN COLOSTRUM DEPRIVED PIGLETS**

Author: Cláudia Cerutti Dazzi

Advisor: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 31 de julho de 2018

*Haemophilus parasuis*, the ethiological agent of Glässer disease, is a Gram-negative coccobacilli of the *Pasteurellaceae* family. Glässer disease is a systemic infection characterized by deposition of fibrinous to fibrinosuppurative material in the joints, serosal surfaces and meninges. Currently, there are 15 typeable serovars (SV) known and classified according to virulence in highly and moderately virulent and avirulent. Since 1992, SV 7 reference strain 174 has been considered an avirulent to mildly virulent serovar. However, in recent years, SV7 has been increasingly isolated not only from lungs, but also from systemic sites such as joints in pigs with classical symptoms of Glässer disease. These findings led us to believe that SV7 might be virulent and able to cause Glässer's disease. To confirm our hypothesis, twenty colostrum-deprived piglets were intratracheally challenged with  $1 \times 10^7$  *Haemophilus parasuis* SV 7, strain 174. Infected piglets had clinical signs consistent with Glässer disease. One piglet died by septic shock in less than 24h post-infection. After 24h, infected piglets had fever (over 40°C), associated firstly with arthritis and then with respiratory signs. With the progression of the disease, at the second and third day post-infection, piglets had neurological signs, arthritis and dyspnea and none of the infected piglet survived after the fifth day post-infection. All piglets were necropsied and tissue samples collected for bacteriological and histopathological analyses. *Haemophilus parasuis* was isolated in chocolate agar and the identity of the SV was confirmed by a multiplex PCR. The main macroscopic findings were polyarthritis, polyserositis and meningitis which are the classical signs of Glässer Disease. Microscopically, these lesions were characterized by neutrophilic and macrophage infiltration in a fibrinous net (fibrinosuppurative infiltrate), associated to few lymphocytes. In addition, we observed thymic aplasia and fibrinosuppurative endophthalmitis. Based on the anatomopathological findings, we observed the possibility of *H. parasuis* overcome hematological barriers in organs such as cerebrum, eye and thymus. We observed ocular lesions in several piglets, yet not described for Glässer Disease, characterized by endophthalmitis and perineuritis of the ocular nerve. With this study we concluded that SV7 strain 174 is capable of causing Glässer disease in highly susceptible piglets and that the classification of this SV should change from avirulent to virulent.

**Key words:** Glässer's Disease; serovar 7; clinical; pathology.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a carne suína conquistou um enorme espaço no comércio mundial de carnes e ocupa lugar de destaque em vários países como a China, hoje o maior produtor e consumidor mundial; em outros países como o México, Rússia e Japão, o consumo da carne suína já ultrapassa o da carne bovina, evidenciando uma drástica mudança no mercado consumidor (1). Atualmente, além da China, os principais produtores de suínos são a União Europeia, Estados Unidos e Brasil (1,2). O Brasil é o quarto maior exportador de carne e derivados de suínos e em 2016 foram comercializadas 1.483 mil toneladas de carne movimentando 732 milhões de dólares; os estados com maior contribuição para esses índices foram Santa Catarina e Rio Grande do Sul (3). Portanto, diante do impacto econômico da suinocultura, é de extrema importância controlar todas as variáveis que impactam negativamente na produtividade, com especial atenção aos aspectos sanitários que representam um dos principais gargalos na produção. Dentre os principais desafios à saúde do rebanho estão as doenças do complexo respiratório com destaque para a Doença de Glässer, causada pelo *Haemophilus parasuis* (4).

O *H. parasuis* é uma bactéria Gram negativa, pleomórfica, da família *Pasteurellaceae* (5–7). Este microrganismo faz parte da microbiota do trato respiratório superior dos suínos e até o momento foram documentados 15 sorovares (SVs) distintos, com diferentes graus de virulência ou potencial patogênico (4,6,8). Os SVs 1, 5, 10, 12, 13 e 14 são classificados como altamente virulentos; os SVs: 3, 6, 7 e 11 são considerados avirulentos e os demais sorovares possuem virulência moderada (4).

A Doença de Glässer normalmente acomete suínos jovens, entre a 5ª e 7ª semana de vida, e manifesta-se por poliartrites, poliserosites (pleurite, pericardite e peritonite fibrinosas) e, em alguns casos, meningites (6,9–11). O primeiro contato dos leitões com o *H. parasuis* ocorre logo após o nascimento, através do contato direto com o trato respiratório da mãe, que transmite as bactérias existentes em sua microbiota naso-faríngea diretamente para o trato respiratório superior de sua prole (8). Nestes casos, a Doença de Glässer poderá ocorrer nos leitões caso os anticorpos maternos não forem suficientemente eficientes para impedir a disseminação sistêmica da bactéria ou em casos onde ocorre imunossupressão dos leitões (6,8,12).

Após o desmame, na creche, entre o 35º e 49º dia de vida do leitão, inicia uma queda gradativa da imunidade materna (8,12). A troca brusca de ambiente, associada ao stress do

desmame, aglomeração de animais de diferentes baias ou mesmo de diferentes granjas, e a grande diversidade de microrganismos que colonizam o trato respiratório, propicia a transmissão de microrganismos e o surgimento de doenças, dentre elas a Doença de Glässer, neste caso, transmitida por aerossóis ou contato direto entre os leitões (13). Os sinais clínicos primeiramente observados na Doença de Glässer são febre, pelos eriçados e tosse, seguidos do aumento das articulações (artrites), dificuldade na locomoção, dispneia e respiração abdominal. Posteriormente, alguns animais podem permanecer em decúbito e/ou apresentar sinais neurológicos como tremores, movimentos de pedalagem, opistótono e decúbito lateral (14,15). Nos casos em que ocorre doença neurológica, o prognóstico é desfavorável e a infecção muitas vezes fatal.

À necropsia, as principais lesões encontradas são peritonite, pleurite, pericardite, artrites e meningite. Essas lesões são variáveis e algumas delas podem não ocorrer em concomitância. Microscopicamente, nos sítios das principais lesões, é observado inflamação fibrinosupurativa, com intenso infiltrado neutrofílico e macrofágico. Além disso, podem ser encontradas pneumonia intersticial, edema pulmonar, lesões vasculares e hemorragias, lesões esplênicas como linfólise entre outras, de acordo com a progressão da doença (14,15).

O tratamento da Doença de Glässer é realizado com antibióticos os quais devem ser utilizados, preferencialmente, após o isolamento bacteriológico e análise de susceptibilidade aos antimicrobianos da bactéria (13,16–18). As perdas econômicas decorrentes da Doença de Glässer são muito expressivas: além do gasto com o tratamento, há redução na produtividade, perda ou descarte de animais infectados e prejuízos à carcaça (19). Visando minimizar tais prejuízos é necessária a vacinação em massa dos suínos.

As vacinas comerciais disponíveis são formuladas comumente a partir de sorovares virulentos (SV5, SV4 e SV1); entretanto, estudos soro-epidemiológicos em suínos evidenciam que nem sempre estes SVs são os mais prevalentes em uma região ou país (20). Além disso, mais de um SV pode causar surtos da doença em uma granja. Assim, as vacinas de bacterinas genéricas podem mostrar-se ineficazes aos sorovares que não presentes nas vacinas, visto que há pouca ou nenhuma indução de proteção heteróloga. A proteção heteróloga é uma resposta imune gerada contra um sorovar de um patógeno, neste caso *H. parasuis*, e capaz de proteger contra outro, ou vários sorovares do mesmo patógeno. Entretanto, vacinas com essa abrangência ainda não estão disponíveis no mercado. Nos casos onde as vacinas comerciais mostram-se ineficazes, é necessário o uso de vacinas autógenas, que são bacterinas desenvolvidas a partir de isolados bacterianos da granja acometida (14,21).

Frente ao problema da proteção heteróloga, o desenvolvimento de vacinas efetivas e abrangentes contra o *H. parasuis* torna-se fundamental para prevenção da Doença de Glässer (12). Vacinas de proteínas recombinantes vêm sendo estudadas contra os diferentes sorovares de *H. parasuis* e, nos últimos anos, estudos tem demonstrado maior eficácia de vacinas experimentais em comparação às comerciais (14,22–24). Ainda, pesquisas com a utilização determinados antígenos bacterianos como a proteína de ligação à transferrina suína (TbpB) mutante na vacinação de suínos tem apresentado resultados imunológicos e de proteção satisfatórios (14,22). A TbpB está presente em diversas bactérias como *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *H. parasuis* entretanto, mesmo sendo uma proteína altamente conservada, a TbpB é classificada em diferentes grupos e a correta seleção do grupo é fundamental para o sucesso da vacinação. Neste caso, o SV7 do *H. parasuis* é uma ótima escolha, pois se encontra no grupo 3 das TbpBs e seus epítomos vacinais podem ser capazes de promover imunidade frente às bactérias pertencentes a esse cluster (22).

O SV7 já foi identificado em granjas na Austrália e China por meio de sorologia e isolamento bacteriano de diferentes órgãos de suínos, como pulmão e articulações (20,25). Somado a estes estudos, o Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada da Universidade de Passo Fundo há alguns anos recebe amostras de campo de todo o Brasil (provenientes de granjas acometidas pela Doença de Glässer) para sorotipificação de *H. parasuis* e, até o momento, uma boa parte destas amostras foram identificadas como SV7 - indicando uma considerável prevalência deste sorovar nos rebanhos brasileiros (Prigol *et al.*, 2018 – dados não publicados). Logo, fica evidente a necessidade de pesquisas com este sorovar específico, tanto pela sua capacidade de induzir proteção heteróloga quanto no entendimento de sua patogenia, uma vez que está classificado como avirulento (4,26).

O foco de nosso grupo de pesquisa é a confecção de novas vacinas de proteínas recombinantes a partir de TbpBs do cluster do grupo 3 (22) explorando o potencial imunogênico e patogênico do sorovar 7 cepa 174, na promoção da Doença de Glässer. O objetivo desta dissertação é relatar os achados anatomopatológicos da infecção pelo SV7 do *H. parasuis* em um modelo de leitões altamente susceptíveis não imunizados e comprovar sua virulência através da observação de lesões fibrinossupurativas características da Doença de Glässer (poliartrite, poliserosites e meningite). Os resultados deste estudo são apresentados no Capítulo 1 da presente dissertação, na forma de um ‘*original article*’ intitulado “*Clinical and pathological characterization of Haemophilus parasuis strain 174 in pigs*”, a ser submetido ao periódico *Research in Veterinary Sciences*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Haemophilus parasuis*

*Haemophilus parasuis* é um patógeno específico de suínos; morfologicamente, é caracterizado como um cocobacilo Gram negativo, pertencente à família *Pasteurellaceae*. É uma bactéria de crescimento fastidioso, aeróbica, e necessita de ferro e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para seu crescimento *in vitro* (27). Quando semeada em placas de ágar chocolate suplementado com NAD e glicose, o *H. parasuis* forma pequenas colônias translúcidas de coloração acinzentada, não hemolíticas (28).

As fimbrias, lipopolissacarídeos (LPS), lipooligossacarídeos (LOS) e proteínas externas de membranas (OMPs) constituem os principais fatores de virulência (6,29–31). O *H. parasuis* também secreta proteases que clivam a IgA, primeira linha de defesa das mucosas (29). Associado a estes fatores, há proteínas de autotransporte denomina vtAs encontradas expostas na membrana bacteriana, que dificultam a fagocitose (32). Também presentes na membrana bacteriana, as proteínas de ligação à transferrina (*Transferin binding protein* = Tbp) A e B (TbpA/TbpB), presentes em alguns membros da família *Pasteurellaceae*, são responsáveis pela captação de ferro e importantes fatores de virulência (33); entretanto, ainda não se sabe se cepas com maior ou menor virulência tem diferentes quantidades de TbpBs em sua superfície.

Os mecanismos bacterianos envolvidos na evasão do sistema imune suíno são a capacidade de prevenir a fagocitose por macrófagos e a capacidade de evitar a ativação da via clássica do sistema do complemento (34). Cepas virulentas evitam a fagocitose pelos macrófagos alveolares (PAMs) pois desenvolvem uma cápsula associado às vtAs (6,32,34,35), a qual também está relacionada à virulência do *H. parasuis* (36,37). Em microrganismos encapsulados, há dificuldade na deposição dos componentes do sistema do complemento, pela via alternativa, sobre a estrutura bacteriana, e isso facilita a implantação e colonização das bactérias no organismo, exceto quando há imunidade humoral específica (p.e. vacinação) para ativação da via clássica do sistema do complemento (34,38).

Até o momento 15 sorovares tipificáveis do *H. parasuis* foram encontrados; essa diferenciação foi obtida através da avaliação da composição das cápsulas por um teste de imunodifusão com antígenos estáveis ao calor (4). Entretanto, em boa parte dos isolados clínicos, essa tipificação não é possível e estes são chamados “não-tipificáveis”, pois possuem



peculiaridades na conformação externa que gera uma indistinção na formação de complexos imunes no processo de imunodifusão e que impede sua caracterização (4,6,39). Em relação aos SV tipificáveis, estes são classificados de acordo com o grau de virulência em altamente e moderadamente virulentos, os quais são responsáveis pela doença de Glässer (DG), ou avirulentos, os quais são colonizadores comensais do trato respiratório superior dos suínos (4).

Os sorovares mais comuns encontrados em granjas, em sítios lesionais, que se tem relatos até o momento são virulentos: SV1, 5, 4, 12 e 14 (9,40). Porém, trabalhos recentes relatam a presença do SV7 isolado de lesões características de DG em granjas de suínos na China e sorologia positiva na Austrália (20,25,41). Um trabalho em particular, feito na Espanha no ano de 1999, relatou a presença do SV7 em quinto lugar de prevalência entre os SV mais predominantes; entretanto os autores não o correlacionaram a DG e o consideraram de baixa ou nula virulência (42). No Brasil, Prigol *et al.* (2018 – não publicado) destaca a ocorrência deste mesmo sorovar, com alta prevalência em granjas de suínos e como causa de surtos de DG em diferentes estados do país.

## 2.2. A Doença de Glässer

A doença de Glässer (DG) foi primeiramente descrita por K. Glässer em 1910, que observou um bacilo como causador de uma síndrome caracterizada pela deposição de material fibrinóide a fibrinosupurativo em diferentes sítios como a pleura pulmonar, pericárdio, articulações, serosas de órgãos abdominais e meninges. Em 1931, esta bactéria foi classificada como *Haemophilus influenzae (suis)*. Somente no ano de 1969 que Bieberteín e White a reclassificaram de *Haemophilus suis*, para *Haemophilus parasuis*, devido à dependência ao fator V da coagulação para crescimento *in vitro*. A morbidade e mortalidade da DG são variáveis, de acordo com a taxa de imunidade do rebanho e virulência do SV responsável pelo surto. Por muito tempo, o *H. parasuis* foi caracterizado como agente secundário de patógenos responsáveis por doenças respiratórias como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (vírus da PRRS), vírus da Influenza, Circovírus, *Bordetella bronchiseptica* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (28). Entretanto, nos últimos anos, surtos causados puramente por *H. parasuis* tem sido identificado, tornando-o agente primário de doenças do trato respiratório.

### 2.2.1. Etiologia

O *H. parasuis* é encontrado de forma comensal no trato respiratório superior de suínos. O primeiro contato dos leitões com o microrganismo ocorre logo ao nascer através do contato direto com o trato respiratório da porca (8). A partir deste momento ocorre a colonização primária do trato respiratório dos leitões, com pico de colonização aos 60 dias de idade (8). Nesta passagem de bactérias da matriz aos leitões, cepas virulentas de *H. parasuis* podem estar presentes nas fossas nasais como parte da microbiota normal e serem transmitidas aos leitões. Na maternidade, a Doença de Glässer é de difícil ocorrência, devido à imunidade colostrar transferida aos leitões pelas mães (43). Portanto, até o desmame, os leitões poderão nunca manifestar a doença ou manifestá-la em um momento de imunossupressão, em que haverá oportunidade de proliferação ao *H. parasuis*.

Após o desmame inicia-se um novo período na vida dos leitões, a creche. Este é um ponto importante na transmissão do *H. parasuis* e implantação da Doença de Glässer em um rebanho. Na creche, animais de diferentes baias ou granjas são reunidos em um mesmo local, todos sob o estresse do desmame e ambientação ao novo alojamento. Aliado ao estresse e suas consequências fisiológicas, outro fator pontual é a queda da imunidade materna. Portanto, neste momento e local temos suínos com imunidade relativamente baixa, junto a animais com diferentes SVs e cepas de *H. parasuis*, cada um com sua microbiota particular. Logo, há uma troca inevitável de microrganismos entre eles tanto por contato direto, como por aerossóis, sendo estes os pontos chave da transmissão e progressão Doença de Glässer (28,40).

### 2.2.2. Patogenia

Acredita-se que o *H. parasuis* colonize o trato respiratório superior e que cepas virulentas alcançam o pulmão onde se estabelecem (29). Depois da colonização pulmonar, a bactéria chega à circulação sanguínea, onde há disseminação hematogênica sistêmica e, como consequência, poliserosites. Esta rota de infecção inicia-se com a lesão do epitélio respiratório e indução de apoptose por meio da liberação de citocinas; os SVs patogênicos promovem a formação de biofilme e resistência à ação do sistema imunológico (44).

O *H. parasuis* possui mecanismos para evasão do sistema imune principalmente a capacidade de resistência aos macrófagos alveolares (35). Do pulmão, provavelmente chegam a corrente sanguínea por lesão e apoptose do endotélio vascular (11,45,46). O *H. parasuis* é resistente à ação do sistema do complemento, o que dificulta sua eliminação do organismo

(34,38). Assim, uma vez na circulação, dissemina-se pelo organismo chegando às serosas e causando as lesões características da Doença de Glässer.

### **2.2.3. Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos comumente encontrados são febre acima de 40°C, pelos eriçados, dispneia, taquipneia, com observação de respiração abdominal (26,47). Há aumento de volume articular posteriormente associado à claudicação e sinais neurológicos variáveis como tremores, movimentos de pedalagem e nistagmo (26,48,49). O aparecimento dos sinais clínicos é variável e ocorre de 24-48h até alguns dias após a infecção; esta variação está intimamente ligada a virulência do sorovar envolvido. Alguns casos podem cursar com morte súbita gerada por choque séptico (48,50). Os sinais clínicos podem ser observados isoladamente ou em conjunto. Animais que sobrevivem à infecção podem apresentar sequelas como artrose, retardo no crescimento e, ao abate, observam-se aderências de órgãos internos (40,51). Essas aderências limitam a expansão da musculatura respiratória dos animais; nos casos de pericardite, há limitações aos batimentos cardíacos, tornando-os letárgicos e inapetentes.

### **2.2.4. Lesões Macroscópicas**

À necropsia são usualmente observadas lesões fibrinóides ou fibrinossupurativas nas articulações, cavidade abdominal, cavidade torácica, pericárdio e meninges, com diferentes graus de acometimento (40). Normalmente, o pulmão é o órgão mais acometido, apresentando, além de pleurite, consolidação crânio-ventral e alterações circulatórias como edema e congestão. Alterações circulatórias em casos hiperagudos são as únicas lesões aparentes e, nestes casos, os animais morrem por choque endotoxêmico (48,52).

As lesões do coração vêm em segundo lugar, onde pode haver desde líquido pericárdico acentuado e levemente amarelado a turvo, até pericardite fibrinossupurativa acentuada (37,53), com aderências do pericárdio ao epicárdio, dificultando a sístole e diástole. Nas articulações mais acometidas, pode ocorrer aumento da turbidez do líquido articular em casos mais brandos; nos casos mais graves, pode-se observar erosão da cartilagem articular com osteíte associada à material fibrinossupurativo abundante (26).

Na cavidade abdominal, além da peritonite, o líquido peritoneal pode apresentar-se com diferentes graus de turbidez e os órgãos abdominais encontrarem-se completamente aderidos entre si e à parede muscular (47). No sistema nervoso central, nota-se congestão vascular intensa associada ou não a edema. O líquido cefalorraquidiano pode ter coloração alterada amarelada a turva. Quando a meningite é acentuada, nota-se uma coloração mais opaca da pia mater (26,40,47,48).

Em casos onde há sobrevivência dos animais e nos locais onde havia poliserosites, são observadas lesões crônicas. Estas lesões constituem-se de tecido fibroso formando aderências que limitam o crescimento e desenvolvimento do animal. Quando graves, há junção do pulmão à pleura parietal e do pericárdio ao epicárdio, além de artrose. Achados estes que, em nível de abate, causam reprovação dos órgãos aderidos e da carcaça. Cabe salientar que estas lesões podem ou não serem concomitantes e que, embora sugira infecção por *H. parasuis*, outros microrganismos que promovam lesões semelhantes como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Pasteurella* spp devem ser considerados (51). Nesse contexto, a coleta de material para exame microscópico e bacteriológico torna-se fundamental.

#### **2.2.5. Lesões Microscópicas**

Microscopicamente, as lesões apresentam-se como infiltrados neutrofílicos associados a macrófagos, junto com material fibrinóide basofílico e restos neutrofílicos; algumas vezes, colônias bacterianas podem ser evidentes (11,40,47,48). Outras células inflamatórias como linfócitos também podem estar presentes neste infiltrado, dependendo da evolução da lesão. Estes achados caracterizam basicamente as lesões fibrinóides macroscópicas e ficam evidentes nas serosas de órgãos, na pleura pulmonar, superfície articular, pericárdio, meninges e tecidos do trato respiratório (54). No pulmão, pode haver pneumonia broncointersticial fibrinóide a fibrinossupurativa (14,48). Nefrite e pielíte também podem ser encontradas junto a outras alterações vasculares como trombos, coagulação intravascular disseminada, congestão, hemorragia e edema em diferentes órgãos (15,49). Linfólise pode ser observada no baço, na zona periarteriolar acompanhada por deposição de fibrina, caracterizando sepse (14).

### 2.2.6. Diagnóstico

Para que a Doença de Glässer seja diagnosticada, o *H. parasuis* deve ser isolado de sítios sistêmicos, pois se trata de um colonizador natural do trato respiratório superior; portanto, o trato respiratório superior não é o local ideal para a coleta principalmente quando se tem doença sistêmica. Ainda, líquidos de locais afetados também podem ser uma boa opção de amostra para isolamento bacteriano (55). O isolamento bacteriano também pode ser realizado através de coletas estéreis de órgãos que contenham lesões fibrinopurulentas. O material coletado é semeado em placas de ágar chocolate suplementadas com NAD e glicose, sob microaerofilia (CO<sub>2</sub> 5%) por um período mínimo de 24h. A partir do crescimento é possível visualizar as pequenas colônias típicas do *H. parasuis* e seguir com o próximo passo de diagnóstico que é a tipificação da bactéria por testes moleculares ou testes bioquímicos, estes últimos já em desuso.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica de identificação e sorotipificação mais utilizada atualmente e apresenta alta especificidade e sensibilidade (56,57). Utilizando-se um conjunto de primers multiplex, é possível em poucas horas identificar o SV isolado ou detectado das amostras e que está presente em um determinado surto (53,58). As bactérias não necessitam estar viáveis para a performance da PCR multiplex; é necessário apenas que tenha uma concentração mínima de DNA para amplificação e caracterização do patógeno. O ELISA é normalmente utilizado para identificar o grau de proteção vacinal de um rebanho, ou ainda, para a detecção de anticorpos colostrais em leitões (8). Além disso, a soroaglutinação foi por muito tempo a técnica de eleição para diferenciação de sorovares (4,59). A imunohistoquímica é uma técnica que utiliza anticorpos para a identificação do agente diretamente na amostra de tecido coletada para histopatologia (60,61). A técnica compõe-se basicamente da utilização de anticorpos primários e secundários associados à um cromógeno, para a detecção de um epítipo específico do *H. parasuis* (62).

### 2.2.7. Tratamento e prevenção

O tratamento básico consiste no uso de antibióticos, preconizando-se testes antimicrobiológicos em casos onde há isolamento bacteriano, para escolher o melhor tratamento a ser instituído no animal ou rebanho afetado e evitar resistência a essas drogas (18,41,43). Entretanto, a melhor forma de combate a esta, e qualquer outra doença infecto

contagiosa, é através da prevenção e profilaxia, neste caso, com o utilização de vacinas e manejo ideais de biossegurança.

As vacinas para a Doença de Glässer encontradas no mercado atual constituem-se, basicamente, de bacterinas genéricas contra um ou dois sorovares virulentos, normalmente SV5 e/ou SV4, algumas delas associadas a um SV avirulento como SV6 (8,21). A vacinação induz anticorpos capazes de proteger contra desafios homólogos e evitar a Doença de Glässer (34). Entretanto, estas vacinas são deficientes na proteção heteróloga, isto é, a proteção contra outros SVs que não aqueles que constituem a formulação vacinal. Quando a Doença de Glässer ocorre em granjas previamente vacinadas, preconiza-se coleta de material preferencialmente de sítios sistêmicos de suínos que morreram em decorrência da infecção ou que se encontram em estado avançado da doença, com necessidade de eutanásia. A partir do material coletado realiza-se o isolamento bacteriano e tipificação do isolado; assim, uma vacina poderá ser produzida especificamente para aquela granja, com o SV que está causando a Doença de Glässer. Este tipo de vacina é chamado de vacina autógena, confeccionada após o crescimento em grande escala das bactérias e inativação (p.e.: formalina); esse tipo de vacina (bacterina) deverá ser associada a um adjuvante e aplicada exclusivamente na granja a partir da qual o SV em questão foi isolado. Apesar de sua eficácia, as vacinas autógenas, infelizmente, não são a solução para resolução da Doença de Glässer. Tanto as vacinas autógenas, quanto as vacinas comerciais disponíveis hoje no mercado, promovem apenas proteção homóloga.

Neste cenário, é necessário que tenhamos uma vacina eficaz, que cubra essa lacuna imunológica e previna a infecção de suínos pelo maior número possível de sorovares. Com esse intuito, grupos de pesquisadores têm estudado diferentes proteínas de superfície do *H. parasuis* como potenciais e promissoras capacidades imunogênicas. É o caso do uso das TbpBs recombinantes (33), que tem apresentado sucesso, demonstrando grande eficácia perante ao desafio com cepas virulentas homólogas (14,63,64) e heterólogas (22). Sequências específicas de TbpBs são clonadas, alteradas geneticamente e produzidas em *Escherichia coli*: o produto são TbpBs alteradas em nível aminoacídico e utilizadas como antígeno vacinal a fim de aumentar sua sensibilidade às células reconhecedoras de antígeno (22). As proteínas vtA também são capazes de induzir proteção heteróloga, mas em um nível menor (32,65). Assim, quando vacinados com estas vacinas de proteínas recombinantes, os suínos apresentarão imunoglobulinas capazes de opsonizar qualquer SV de *H. parasuis*, ou os sorovares que as expressem, como por exemplo, os SVs que se encontram inseridos no Grupo 3 das TbpBs (22,23,33).

### 3. CAPÍTULO 1.

#### Original Article

#### **Clinical and pathological characterization of *Haemophilus parasuis* strain 174 in pigs**

C.C. Dazzi<sup>a</sup>, J.A. Guizzo<sup>a</sup>, S.R. Prigol<sup>a</sup>, L.F. Soveral<sup>a</sup>, R.L. Klein<sup>a</sup>, L.C. Kreutz<sup>a</sup>, R. Frandoloso<sup>a</sup> \*.

<sup>a</sup>*Laboratory of Microbiology and Advanced Immunology, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, Passo Fundo, 99052-900, Brazil.*

\* Corresponding author.  
*E-mail address:* rfran@upf.br (R. Frandoloso).

## ABSTRACT

*Haemophilus parasuis* is a Gram-negative bacterium that causes Glasser's Disease, mostly seen in young swine, characterized by polyarthritis, polyserositis and meningitis. The bacterium has at least 15 known serovars classified according to the ability to cause disease. Serovars 1, 4, 5 and 12 are considered of high virulent and usually used in most studies. Serovars 3, 6, 7, 9 and 11 are considered avirulent; however, recent reports showed that serovar 7 is somehow emerging in herds all over the world suggesting that its virulence status might have changed. This prompted us to infect colostrum-deprived piglets with SV 7 strain 174 and characterize clinical and pathological signs. We found that SV 7 caused clinical signs consistent with Glässer disease in all infected piglets that succumbed to infection up to day 5 post-infection. Macroscopic and microscopic lesions were consistent with those found during infection of piglets with virulent serovars. In addition, we describe novel microscopic lesions associated with Glässer disease such as endophthalmitis. Thus, our findings indicate that SV 7 causes classical signs of Glässer disease in colostrum-deprived piglets and it should be included into the group of virulent serovars.

*Keywords:* *H. parasuis*; Serovar 7; Glasser's Disease; Pathology.



## Introduction

Glasser's Disease (GD) is an emergent worldwide disease caused by *Haemophilus parasuis*, a Gram-negative bacterium that belongs to the *Pasteurellaceae* family. Clinically, GD is characterized by polyserositis, polyarthritis and meningitis (Biberstein and White, 1969) and affects mainly young pigs in the nursery phase. Fifteen serovars are well characterized based on the capsule composition and they are classified as nonvirulent, moderate and highly virulent according to their ability to cause disease in infected pigs (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).

According to the initial reports published by Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), *H. parasuis* serovar 7, strain 174, was unable to cause GD in piglets after intraperitoneally challenge. Years later, Brockmeier et al. (2014) performed a new infection study and showed similar results after challenging highly susceptible piglets by the intranasal route. Both authors have classified SV7 strain 174 as a nonvirulent strain. More recently, Guizzo et al., (2018) showed that the same strain inoculated by intratracheal route in highly susceptible piglets was capable to trigger GD in all challenged animals, suggesting the need to reclassify strain 174.

GD outbreaks associated with *H. parasuis* SV7 were also recently described in Chinese swine herds and this serovar was frequently isolated from systemic sites of sick animals (Wang et al., 2017). In Australia, nasal samples obtained from pigs showing clinical signs suggestive of GD were positive for *H. parasuis* SV7 (Turni and Blackall, 2010). Thus, these data along with the experimental infection experiment described by Guizzo et al., (2018) provide strong evidence that *H. parasuis* SV7 might be capable to trigger GD outbreaks.

Experimental reproduction of GD is not easy and normally it is performed in a highly susceptible animal model (specific pathogen-free, caesarean-derived, colostrum deprived pigs and natural farrow, colostrum-deprived pigs) using mainly *H. parasuis* Nagasaki strain (serovar 5) (Amano et al., 1996, 1994; Bello-Orti et al., 2014; Brockmeier et al., 2014; Frandoloso et al., 2012b, 2011; Palzer et al., 2015; Segales et al., 1997), or by serovar 4 (Amano et al., 1996, 1994; Bello-Orti et al., 2014; Turni and Blackall, 2007), SV 12 (Turni and Blackall, 2007) and SV 1 (Amano et al., 1994).

The clinical signs commonly observed in pigs infected with virulent serovars are shaggy hair, fever, joint swelling and lameness associated to respiratory difficulties (coughing, sneezing, dyspnea or taquipnea) latter progressing to neurological signs and death (Frandoloso et al., 2011). Necropsy findings are fibrinoid arthritis, peritonitis, pleuritis,

pericarditis and meningitis (Amano et al., 1994; Vahle, 1996). Microscopically, these lesions are characterized by fibrinosuppurative material deposition matching macroscopically affected organs findings. Sometimes, meningitis is seen only by microscopic analysis. Besides fibrinosuppurative polyserositis, interstitial pneumonia or fibrinosuppurative bronchopneumonia can be seen in lungs. Disseminated intravascular coagulation, vascular thrombosis, hemorrhages, congestion and edema in different organs (mostly lungs and brain) can be present (Bello-Orti et al., 2014; Segales et al., 1997). In acute cases, septic chock alterations are the most common visualisation (Amano et al., 1997, 1994).

In this study, we present clinical and pathological lesions caused by *H. parasuis* serovar 7 strain 174 in naturally farrowed colostrum-deprived pigs and microscopic lesions not yet described in *H. parasuis* infection.

## Materials and Methods

### *H. parasuis* strain and growth condition

*H. parasuis* was grown according to Guizzo, et al. (2018): an aliquot of SV7 reference strain 174, which was previously passaged in pigs, was placed into supplemented PPLO broth (NAD and D-glucose) and grown under shaking (250rpm/37°C) to achieve an optical density of 0.4 at 600nm. The bacteria were collected by centrifugation, washed twice in PBS (137 mM NaCl [Sigma-Aldrich, USA], 2.7 mM KCl [Sigma-Aldrich,USA], 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [Sigma-Aldrich, USA], 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [Sigma-Aldrich] pH 7.2) and counted using Flow Cytometry (FACSVerse Cytometer - Becon Dickinson, USA) to quantify the challenge inoculum. The concentration was adjusted to 1x10<sup>7</sup> bacteria in a final volume of 2 ml of RPMI 1640 (Invitrogen, USA) medium.

### Pig experimental infection and clinical evaluation

Twenty snatch-farrowed colostrum-deprived piglets (DB Genética Suína, Brazil) selected from 5 different sows from a high health status herd were obtained and raised as described (Guizzo et al., 2018). At day 42, piglets were anesthetized using the following drug combination: 0.3 mg/kg of acepromazine (Syntec do Brasil, Brazil), 0.3 mg/kg of midazolam (Laboratório Teuto Brasileiro, Brazil) and 15 mg/kg of Ketamine (Ceva Santé Animale,

Brazil) inoculated by the intramuscular route. *H. parasuis* challenge was performed via intratracheal route with  $1 \times 10^7$  *H. parasuis* serovar 7 strain 174. During challenge, rectal temperature and the perimeter of the radio-humeral, carpal, hock and tarsal – right and left joints were measured (cm) in all animals using a measuring tape. In the following days, rectal temperature and clinical symptoms such as joint swelling, lameness, dyspnea, taquipnea, coughing, sneezing and neurological signs were verified and annotated at 12 hours intervals until animal's death. When symptoms were too aggressive or the animals demonstrated signs of intense suffering, they were anesthetized with the same protocol used in the challenging day and then euthanized by intracardiac injection of 0.3 ml/kg of embutramide (MSD, Intervet GmbH, Germany).

#### Necropsy and sampling

At the time animals died, or when euthanized *in extremis*, necropsy was immediately performed and documented. The *post-mortem* joints' perimeters were measured with the same tape as in challenge. The carcass was laid in dorsal decubitus and the members were rebated. After that, sterile incisions in the abdominal and thoracic cavities were made for bacteriological sampling, the same care was taken for pericardium, central nervous system and articulations (normally radio humeral articulation). After sampling, the ribs and sternum were removed to expose the lungs and heart, and the abdominal cavity. The organs were removed one by one, first the abdominal organs followed by the thoracic organs. The head skin was removed exposing frontal, parietal and occipital bones; a hacksaw was sterilized by fire and used to crack the bones in a triangle incision trough frontal and lateral borders. After removing the skullcap, an incision was made through the meninges with a sterile scalp blade to collect swabs for bacteriological assay. Macroscopical and microscopical lesions were scored as no alterations, mild, moderate and accentuated changes.

#### Sampling growth and Molecular detection

Swab samples taken during necropsy were seeded in chocolate agar plates and incubated at microaerophilic environment (37°C under 5% CO<sub>2</sub>) for 24-48h. *H. parasuis* colonies were isolated from chocolate agar plates and placed in 100µL of ultrapure water (Sigma-Aldrich, USA). The samples were then heated at 95°C for 10 minutes and centrifuged at 13.000 rpm for 10 minutes. After that, the supernatant containing DNA was collected and

analysed using a spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) and then used to perform multiplex PCR according to the protocol reported by Howell, et al (2015).

## Histology

Fragments of all organs were collected, fixed in 10% buffered formalin, processed in an automatic tissue processor (PT09, Lupetec, Brazil), paraffin embedded, sectioned at 5µm and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis. Microscopic lesions were scored as mild changes (+), moderate changes (++) and accentuated changes (+++).

## Ethics statement

The experiment was approved by the institutional Committee for Ethical Use of Animals (CEUA protocol no. 018/2016) and followed the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines.

## Results

### Clinical observation

All animals presented permanent fever above 40°C since the first day post challenge (dpc) reaching a peak of 41,8°C (Figure 1); the fever persisted until animal's death. Also at the first dpc, all pigs presented apathy and hyporexia; five animals presented lameness (n° 14, 15, 17, 18 and 20), two showed dyspnea (n° 17 and 20), and another two neurological signs (n° 2 and 14). Pigs n° 4, 8 and 14 died in less than 36h post challenge. By the second and third dpc, all animals were apathetic with anorexia or hyporexia and presented cyanotic mucosal and some had cold extremities. Lameness and joint swelling were the most prominent clinical observation, followed by dyspnea and neurological signs as trembling, lateral decubitus, paddling, and nystagmus. A few animals presented intensely congested sclera with opaque cornea, as in keratitis, and two of them apparently were blind. Only animals n° 3, 11, 15 and 16 survived until the fourth day and they all had lameness and dyspnea; animal 16 had neurological signs as ataxia, paddling and vocalization with decreasing temperature to 38,9°C. At the fifth day after challenge all animals had died.

## Macroscopical lesions and cultured *H. parasuis*

Nineteen animals presented GD lesions, except one (n° 4) that died in less than 24h after challenge, and had septicemic lesions as petechiae in sites as epicardium, lungs and thymus. The other swine lesions were basically composed of fibrinoid pleurisy, pericarditis and arthritis as the most common alterations, followed by fibrinoid peritonitis and meningitis. The GD classical lesions are listed in table 1 but not all lesions were observed simultaneously in the same animal; the pig (n° 8) who died by the second dpc presented discrete arthritis only with positive growth for *H. parasuis* SV7. Most lungs presented cranioventral consolidation, interlobular edema and were non-collapsed with rubberish consistency, mostly associated with congestion and with pleural adherences due to pleurisy. Sometimes, pleurisy was so severe that the lung was attached to the pericardium and surrounding tissues. Hearts had different degrees of pericarditis, from fibrin strings and turbid amber pericardium liquid to white-yellowish rough aspect, covering all or most of it, with pericardium adherence and coronarian congestion. Discrete arthritis was characterized as turbid amber to yellowish synovial fluid, containing or not fibrin strings (positive in bacteriological sampling). Severe arthritis had enlarged surface and deposition of friable yellow material, the surrounding tissues as tendons and muscles were involved, presenting edema and a similar content. Radio-humeral was the most frequent site of arthritis, followed by hock joint. Fourteen animals (except n°s 1, 2, 4, 10, 14 and 19) presented at least 1cm (varied from 1 to 3cm) enlargement in *post mortem* articular perimeter, indicating that SV7 induces visible clinical joint alterations. Peritonitis was verified as presence of fibrin strings or intense fibrinoid deposition, with or without free liquid at the cavity. In the pigs that died at the fourth dpc (n° 3, 17, 18 and 19) peritonitis was intense and covered most of the abdominal cavity with internal organs adherences. The pancreas of pigs with peritonitis was pale, firmly consistent with white spots. Brain and cerebellum showed congestion and swelling with brain gyri flattened and widened, besides meningitis; in some animals' cerebellum, vermis was herniated into the occipital foramen, with focal intense haemorrhage. Interesting, most macroscopical meningitis were more prominent in cerebellum and brainstem with accentuated fibrin deposition. Four animals (n° 7, 10, 13, and 18) presented corneal opacity with scleral congestion and optical nerve congestion. All animals showed growth for *H. parasuis* in all sampling sites, except the peritoneal swab animal n° 8 which at necropsy had no signs of fibrin deposition or liquid alterations. Main lesions are seen in Figure 2.

## Microscopical lesions

Major polyserositis were characterized by deposition of delicate fibrine nets associated to abundant neutrophils, sometimes degenerated causing a suppurative aspect, and macrophages, with abundant cytoplasm filled or not with granular basophilic material, resembling coccobacilli bacteria. Many vascular alterations were seen in most organs as thrombotic formation, disseminated intravascular coagulation, congestion and haemorrhages; those alterations will not be pointed in each organ because they appeared in all animals, just in different degrees. Blood and lymphatic vessels in different organs appeared to be full of inflammatory cells in an inflammatory vascular cap or occlusion. Lungs also presented suppurative multifocal interstitial or bronchointerstitial pneumonia with interlobular septa distention, associated to fibrin deposition and inflammatory infiltrate with neutrophil predominance, atelectasis and, endothelial damage as degeneration and necrosis. Mediastinal and mesenteric lymph nodes had suppurative lymphadenitis, some had lymphoid depletion associated. Spleen of most animals presented white pulp depletion, with or without lympholysis and, discrete red pulp depletion. Kidneys, liver and pancreas had discrete cell infiltrate composed mostly by mononuclear cells, as lymphocytes and, sparse neutrophils, characterizing discrete pyelitis, nephritis, pancreatitis and hepatitis. At central nervous system, meningitis was the main lesion and was seen in 13 animals in different intensities from discrete to severe. Also, edema, neuronal injuries as ischemia, perivascular cuffing (n°1, 5, 6, 10, 12, and 18) with blood vessels inflammatory cap were observed. Swines n°1 and 6 had accentuated focal suppurative leukoencephalomalacia near lateral ventricle, with ventricle space filled with fibrinosuppurative content, same as in meningitis. Four animals (n° 7, 10, 13 and 18) with meningitis had optical nerve fibrinosuppurative perineuritis and corneal degeneration. Animals n°10 and 13 also had abundant neutrophils and fibrinoid material admixed within conjunctiva, attached to corneal endothelium. Iris and ciliary body contained moderate mixed infiltrate, mostly composed of neutrophils and macrophages; these cells exfoliated into anterior and posterior chambers, associated with fibrin, and this content was seen adhered to corneal endothelium. The same content was seen in filtration angle and trabecular meshwork. Neutrophils were seen in choroid, posterior cavity and vitreous humor, and associated in the surface retinal layer. Congestion of retinal vessels were a prominent finding. The inflammation of all those ocular segments characterizes endophthalmitis. Most of these lesions are seen in Figure 3.

## Discussion

The clinical findings match perfectly with GD; the clinical course was permanent fever, lameness, respiratory distress and in some cases neurological signs as caused by other serovars (Amano et al., 1996, 1994; Frandoloso et al., 2011; Fuente et al., 2009; Segales et al., 1997; Vahle et al., 1995). Eye congestion and corneal opacity, as observed in our study, have not been described yet in any experimental study involving *H. parasuis* and are firstly reported here for GD.

Different degrees of lesions were seen at different dpc, varying from acute sepsis to polyserositis (Amano et al., 1994). Pleurisy varied in different degrees as yellowish fibrin net partially covering one pulmonary lobe or diffusely distributed in both lobes associated to costal pleurae adhesions. Pericarditis, with exception of three pigs, appeared as a rough, irregular whitish to yellow material covering totally or partially the heart, promoting pericardial tamponade. Dense yellowish fibrin to fibrinosuppurative content covered 1/3 to 3/3 of abdominal cavity, mainly when accentuated peritonitis was present. Some animal had mild peritonitis characterized by yellow fibrin strings spread over the cavity. In lungs, microscopically, besides fibrinosuppurative pleuritis, a few animals demonstrated endothelial necrosis and perivascular hemorrhage, associated with suppurative bronchopneumonia or suppurative bronchointerstitial pneumonia. Additionally, thrombotic formation in capillary vessels was seen in different organs such as lungs, kidneys and liver (Amano et al., 1994), which are typical findings in endotoxemic infections (Amano et al., 1997). Discrete suppurative nephritis was seen in a few animals, followed or not by pyelitis (Palzer et al., 2015). Foci of discrete mixed hepatitis and pancreatitis were seen, probably caused by sepsis and peritonitis (Vahle et al., 1995). Spleen presented lymphoid depletion, with eventual and discrete splenitis and lympholysis (Frandoloso et al., 2011) and lymphadenitis in different lymph nodes, mostly those draining *H. parasuis* rich sites, as mediastinal lymph nodes (Fuente et al., 2009).

Fibrinoid arthritis was majorly seen in radio-humeral articulation, always positive cultured for *H. parasuis* SV7. Large articular surfaces are predisposed to septic arthritis, that happens due to haematogenous bacterial dissemination that reaches the synovial vasculature, such as epiphyseal capillaries, allowing pathogens to gain entrance in the articulation space (Ali et al., 2015; Shirtliff and Mader, 2002; Visco et al., 1990). Once inside it, the pathogen dispose of all nutrients required to its grown and colonization, given by the synovial fluid which is composed in most part by glycines, serotransferrin and other nutrients necessary to



bacterial survival (Bennike et al., 2014; Shirtliff and Mader, 2002). We noted at this point that the animals presented lameness before respiratory signs, suggesting that an haematogenous dissemination occurred before significant lung alterations or even before bacteria reaching the lung. Added to that, we suggest that the same happens with pericardium: during bacteremia the pathogen reaches the heart via coronarian vessels that irrigate heart trough small openings near mitral valve.

The central nervous system (CNS) of seven animals was covered in a grayish and opaque content with or without fibrin strings (when dura mater was rebated), classified as macroscopical meningitis, associated with severe congestion and edema. The macroscopical and microscopical findings allowed us to think of intracranial pressure elevation, associated with all *H. parasuis* inflicted lesions. The cerebellum protrusion was probably due to elevated intracranial pressure caused by meningitis and edema (Horwitz et al., 1980; Rennick et al., 1993), and the haemorrhage focuses were caused by contact between cerebellar tissue herniation within occipital bone. Another significant and curious finding was that meningitis was always more prominent in cerebellum and brainstem than in telencephalon and, the piglets with severe degree of meningitis presented clinical neurological signs according to the most affected CNS portions. The encephalitis associated to perivascular cuffing and congestion confirms data of bacteriological *H. parasuis* isolation and identification in intracerebral collection (Frاندoloso et al., 2012b) and also confirms the hypothesis that it uses specialized microvascular endothelial cells to reach brain parenchyma (Bouchet et al., 2008; Vanier et al., 2006). As we noted, fibrinosuppurative content was present admixed with choroidal plexus, mostly in its cerebellar portion. This leads to another possible way of *H. parasuis* reaching CNS by transposing blood-brain barrier in choroidal plexus getting into ventricles via cerebrospinal fluid. This way justifies the accentuated cerebellum affection once it is placed closely to one of choroidal plexus (Killer, 2013). We further suggest that cerebrospinal fluids, as synovial fluid, are a favorable environment to *H. parasuis* growth and colonization, once it has different nutrients necessary to bacteria maintenance such as glycose and minerals (Bennike et al., 2014; Terlizzi and Platt, 2006).

The eyes of slightly blind pigs had optical nerve fibrinosuppurative perineuritis, endophthalmitis and corneal degeneration. Endophthalmitis caused by *Haemophilus influenzae* in humans has been reported in an one-year old child who had confirmed case of *H. influenzae* meningitis (Haruta et al., 2017). Also, the same pathogen caused endophthalmitis through a filtrating glaucoma mechanism contamination (Durand, 2017). We believe that the most probable way of eye infection in pigs was trough haematogenous



dissemination by blood vessels overpassing the blood-ocular barrier (Haruta et al., 2017), mainly because of anterior chamber endophthalmitis. The probable way of perineuritis was via infected cerebrospinal fluid flowing across the fourth ventricle and reaching optical nerve sub-arachnoid space (Killer, 2013) probably secondary to meningitis, once all animals who had optical nerve lesions also presented a high degree of fibrinosuppurative meningitis.

In some animals, thymus was aplastic with loss of corticomedullar relation. Sepsis by Gram negative bacteria releases endotoxins and membrane polysaccharides (LPS) and it can induce thymic atrophy due to a fail of common lymphoid progenitors in expressing CCR9 and P-selectin ligands (Amano et al., 1997; Inkler, 2016). At the same time, there is a downregulation in the production of cells from the lymphoid lineage and an upregulation in myeloid lineage cell production, leading to a Gram negative sepsis-inducing lack of lymphoid cells (Inkler, 2016). Conjointly, macrophage cytokines as IL-10 and TNF- $\alpha$  secreted directly into thymus parenchyma induce apoptosis of T lymphocytes *in situ* (Fuente et al., 2009; Paola et al., 2016). All these concomitant events lead to a T lymphocyte scarcity in organism and further immunological breakdown, due to a lack of lymphocyte precursors and a deficiency on its ligand expressors. We are not sure if *H. parasuis* causes direct lesion in thymus parenchyma by transposing blood-thymic barrier or the lesions observed are caused simply by LPS sepsis. Anyway, our previous data shows us that *H. parasuis* has lympholytic activity at CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> resulting in lack of this lymphocytes in blood flow (Frاندoloso et al., 2012a), it will be senseless if we discard the possibility of this pathogen acting inside thymic parenchyma destroying those lymphocytes, in this case, justified by the presence of a considerable quantity of macrophages phagocytizing lymphocyte remains. In another previous study we demonstrated that *H. parasuis* is able to adhere and invade porcine aorta endothelial cells (Frاندoloso et al., 2013) which lead us to suggest that blood-barrier breakthrough is plausible.

*H. parasuis* was isolated from all swabs collected and the identity of SV7 was confirmed by PCR (Guizzo et al., 2018) proving that SV7 strain 174 was the pathogen that induced the lesions observed.

## Conclusions

We suggest that *H. parasuis* reaches bloodstream way before lung pathogenesis mostly because arthritis is observed within hours post inoculation and prior to respiratory signs. Another possibility is that body fluids that irrigate complex cells (neurons) and great energy consuming cells (cardiomyocytes, joint cells) contain the nutrients necessary for *H. parasuis* grown, such as NAD, glycines, vitamins, minerals, even iron or conjugated transferrin. After that, *H. parasuis* reaches bloodstream until it finds a proper place to colonize such as synovial fluid, cerebrospinal fluid, pericardial liquid or interstitium. Further studies about *H. parasuis* pathogenesis should be carried to answer these questions, together with the molecular characterization of these fluids.

Our findings enable us to ensure that *H. parasuis* SV7 strain 174 causes Glasser's Disease and it should be reclassified as a virulent strain. We also suggest that *H. parasuis*, promotes brain microvascular endothelial cells permeability and cytokine liberation facilitating meningitis and brain damage, enable it also to transpose other blood-endothelial barriers as ocular, causing local damage. Finally, because *H. parasuis* LPS blocks lymphoid precursor cell receptors causing an immune T mediated response breakdown associated with all those events we reported here, an irreversible picture is designed and death is inevitable.

## Acknowledgements

This work had financial support from the Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT) do Estado do Rio Grande do Sul (Convênio SDECT 2438/2014 processo 338-25.00/14-0). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance code 001. L.C. Kreutz holds a fellowship from CNPq (Produtividade em Pesquisa - PQ 307900/2016-9).

## References

- Ali, R.A., Kaplan, S.L., Rosenfeld, S.B., 2015. Case Report Polyarticular Septic Arthritis Caused by *Haemophilus influenzae* Serotype f in an 8-Month-Old Immunocompetent Infant : A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep. Orthop.* 2015, 1–5. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/163812>
- Amano, H., Shibata, M., Kajio, N., Morozumi, T., 1996. Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 58 (6), 559–561.
- Amano, H., Shibata, M., Kajio, N., Morozumi, T., 1994. Pathologic Observation of Pigs Intranasally Inoculated with Serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* Using Immunoperoxidase Method. *J. Vet. Med. Sci.* 56 (4), 639–644.
- Amano, H., Shibata, M., Takahashi, K., Sasaki, Y., 1997. Effects on Endotoxin Pathogenicity in Pigs with Acute Septicemia of *Haemophilus parasuis* Infection. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 451–455.
- Bello-Orti, B., Costa-Hurtado, M., Martinez-Moliner, V., Segalés, J., Aragon, V., 2014. Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract. *Vet. Microbiol.* 170, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.011>
- Bennike, T., Ayturk, U., Haslauer, C.M., Froehlich, J.W., Pro, B.L., Barnaby, O., Birkelund, S., Murray, M.M., Warman, M.L., Stensballe, A., 2014. A Normative Study of the Synovial Fluid Proteome from Healthy Porcine Knee Joints. *J. Proteome Res.* 13, 4377–4387. <https://doi.org/10.1021/pr500587x>
- Biberstein, E.L., White, D.C., 1969. A PROPOSAL FOR THE ESTABLISHMENT OF TWO NEW HAEMOPHILUS SPECIES. *J. MED. MICROBIOL.* 2, 75–78.
- Bouchet, B., Vanier, G., Jacques, M., Gottschalk, M., 2008. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells. *Vet. Res.* 39, 42. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008019>
- Brockmeier, S.L., Register, K.B., Kuehn, J.S., Nicholson, T.L., Loving, C.L., Bayles, D.O., Shore, S.M., Phillips, G.J., 2014. Virulence and Draft Genome Sequence Overview of Multiple Strains of the Swine Pathogen *Haemophilus parasuis*. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103787>
- Durand, M.L., 2017. Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 597–613.

- Frاندولoso, R., Martínez-Martínez, S., Yubero, S., Rodríguez-Ferri, E.F., Gutiérrez-Martín, C.B., 2012a. New insights in cellular immune response in colostrum-deprived pigs after immunization with subunit and commercial vaccines against Glässer's disease. *Cell. Immunol.* 277, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.05.010>
- Frاندولoso, R., Martínez-Martínez, S., Rodríguez-Ferri, E.F., Gutiérrez-Martín, C.B., 2012b. Comparison of real-time PCR and culture isolation in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 149–152. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03187.x>
- Frاندولoso, R., Martínez, S., Rodríguez-ferri, E.F., Jose, M., Pe, C., Martínez-ferna, B., Gutie, B., 2011. 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 18, 50–58. <https://doi.org/10.1128/CVI.00314-10>
- Frاندولoso, R., Pivato, M., Martínez-Martínez, S., Rodríguez-Ferri, E.F., Carlos Kreutz, L., Gutiérrez Martín, C.B., 2013. Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of AOC-45 porcine aorta endothelial cells. *BMC Vet. Res.* 9, 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-207>
- Fuente, A.J.M. de la, Ferri, E.F.R., Tejerina, F., Frاندولoso, R., Martínez, S.M., Martín, C.B.G., 2009. Cytokine expression in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Res. Vet. Sci.* 87, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.012>
- Guizzo, J.A., Chaudhuri, S., Prigol, S.R., Yu, R., Dazzi, C.C., Balbinott, N., Frاندولoso, G.P., Kreutz, L.C., 2018. The amino acid selected for generating mutant TbpB antigens defective in binding transferrin can compromise the in vivo protective capacity. *Scien* 8:7372, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25685-1>
- Haruta, M., Yoshida, Y., Yamakawa, R., 2017. Pediatric endogenous *Haemophilus influenzae* endophthalmitis with presumed hyposplenism. *Int. Med. Case Rep. J.* 10, 7–9.
- Horwitz, S.J., Boxerbaum, B., Bell, J.O., 1980. Cerebral Herniation in Bacterial Meningitis in Childhood. *Ann Neurol* 7, 524–528.
- Inkler, W., 2016. Sepsis-Induced Thymic Atrophy Is Associated with Defects in Early Lymphopoiesis. *Stem Cells* 34, 2902–2915.
- Kielstein, P., Rapp-Gabrielson, V.J., 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.* 30, 862–865.

- Killer, H.E., 2013. Production and Circulation of Cerebrospinal Fluid With Respect to the Subarachnoid Space of the Optic Nerve. *J. Glaucoma* 22, 8–10.  
<https://doi.org/10.1097/IJG.0b013e318293498b>
- Palzer, A., Austin-Busse, R.L., Ladinig, A., Balka, G., Zoels, S., Ritzmann, M., 2015. Histopathologic lesions in conventional pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis* serovar 5. *Tierarztl. Prax. Ausgabe G Grosstiere - Nutztiere* 43, 91–96.  
<https://doi.org/10.15653/TPG-140905>
- Paola, S., Gómez-laguna, J., Carrasco, L., Rodríguez-gómez, I.M., Caridad, J.M., Graham, S.P., Frossard, J., Steinbach, F., Salguero, F.J., 2016. Thymic depletion of lymphocytes is associated with the virulence of PRRSV-1 strains. *Vet. Microbiol.* 188, 47–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.005>
- Rennick, G., Shann, F., Campo, J. De, 1993. Cerebral herniation during bacterial meningitis in children. *BMJ* 306, 953–955.
- Segales, J., Domingo, M., Solano, G.I., Pijoan, C., 1997. Immunohistochemical Detection of *Haemophilus Parasuis* Serovar 5 in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues of Experimentally Infected Swine. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9, 237–243.  
<https://doi.org/10.1177/104063879700900303>
- Shirtliff, M.E., Mader, J.T., 2002. Acute Septic Arthritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 527–544.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.527>
- Terlizzi, R. Di, Platt, S., 2006. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion in companion animals : Part I – Function and composition. *Vet. J.* 172, 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.021>
- Turni, C., Blackall, P.J., 2010. Serovar profiling of *Haemophilus parasuis* on Australian farms by sampling live pigs. *Australian Vet. J.* 88, 255–259. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2010.00592.x>
- Turni, C., Blackall, P.J., 2007. Comparison of sampling sites and detection methods for *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* 85, 177–184. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00136.x>
- Vahle, J.L., 1996. Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection in swine. Iowa State University.
- Vahle, J.L., Haynes, J.S., Andrews, J.J., 1995. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 476–480. <https://doi.org/10.1177/104063879500700409>
- Vanier, G., Szczołka, A., Friedl, P., Lacouture, S., Jacques, M., Gottschalk, M., 2006.

Haemophilus parasuis invades porcine brain microvascular endothelial cells.  
Microbiology 152, 135–142. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28312-0>

Visco, D.M., Hill, M.A., Sickle, D.C.V.A.N., Kincaidt, S.A., 1990. The development of centers of ossification of bones forming elbow joints in young swine. J. Anat. 171, 25–39.

Wang, Z., Zhao, Q., Wei, H., Wen, X., Cao, S., 2017. Prevalence and seroepidemiology of Haemophilus parasuis in Sichuan province , China. PeerJ 5:e3379 ht.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.3379>

**Table 1.**

Main pathological findings and intensity according to day of death post challenge.

Findings	Pig number																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Death (dpc)</i>	4 <sup>th</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	1 <sup>st</sup>	4 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	2 <sup>nd</sup>	5 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>
<i>Pleuritis</i>	+++	+	Ø	Ø	Ø	++	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+++	Ø	++	+++
<i>Pericarditis</i>	+	+++	++	Ø	++	+	++	Ø	+++	+++	++	++	++	+++	++	+	+++	+++	++	+++
<i>Polyarthritis</i>	++	+	++	Ø	+	+	+++	Ø	++	+++	++	+++	Ø	++	+++	+++	++	+++	+++	++
<i>Peritonitis</i>	Ø	+	+++	Ø	Ø	+	++	Ø	++	++	++	Ø	++	+	+	Ø	+++	+++	+++	++
<i>Meningitis</i>	+++	++	Ø	Ø	+++	+	++	Ø	+	+++	Ø	+++	+++	Ø	Ø	+++	+	++	Ø	+

Ø – none; + – mild; ++ – moderate; +++ - accentuated

### Figure captions

Figure 1. Clinical evolution representation indicated by temperature versus days post challenge (dpc). The red dot line represents the fever limit line (39.6°C).

Figure 2. Meningitis (A and B), polyarthritis (G) and polyserositis (E, F and H) caused by *Haemophilus parasuis* SV7 strain 174. Detail to prominent meningitis in cerebellum (B). Corneal opacity (C) associated with congestion of optical nerve (D) in endophthalmitis cases.

Figure 3. A) Fibrinosuppurative meningitis with perivascular cuffing. H&E, 50x. B) Intense hemorrhage in cerebellar subarachnoid space, with fibrinosuppurative deposition above medulla oblongata. H&E, 50x. C) Fibrinosuppurative endophthalmitis of the anterior chamber, with content attached to the internal cornea. H&E, 50x. D) Optical nerve, from left to right, hemorrhage; fibrinosuppurative perineuritis; optical nerve itself, there is a distention of neural sub-arachnoid space, by inflammatory content. H&E, 200x. E) Fibrinosuppurative pericarditis with inflammatory spread through heart layers until myocardium. H&E, 50x. F) Fibrinosuppurative pleuritis, with septal distension by the same infiltrate, associated with bronchointerstitial pneumonia and intense vascular congestion. H&E, 50x. G) Fibrinosuppurative arthritis. H&E, 50x. H) Fibrinosuppurative peritonitis. H&E, 50x.

Figure 4. Thymus cortical zone from the *H. parasuis* strain 174 intratracheal infected colostrum-deprived swine. There is a marked lymphoid depletion, with thin and delicate basophilic material deposition amongst cells that resembles fibrin strings. There are multiple macrophages and vessel congestion. At the left lower corner there is distention of the interlobular space, filled with fibrin resemblance material amongst inflammatory cells. H&E, 400x.



Figure 1.

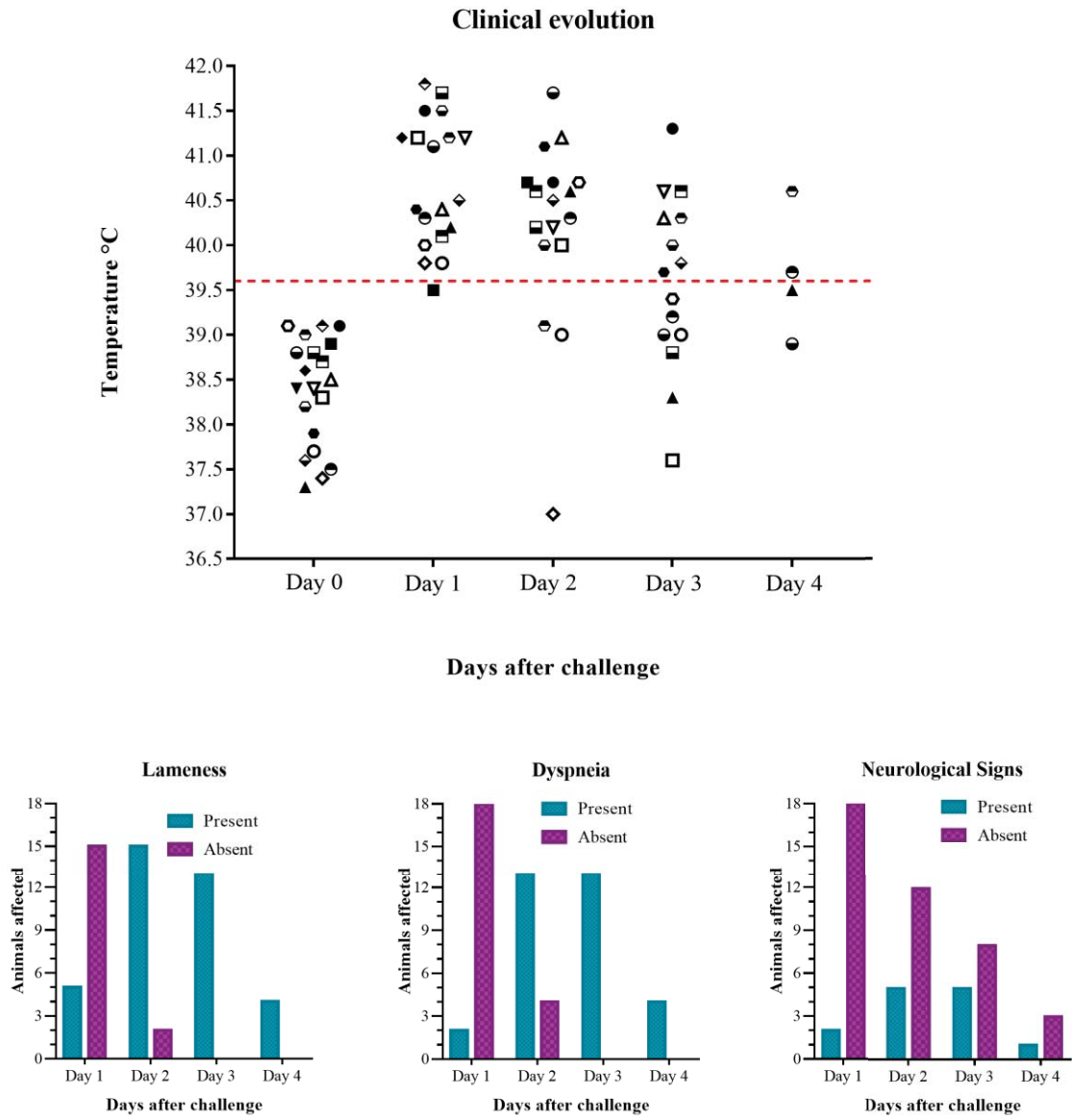


Figure 2.

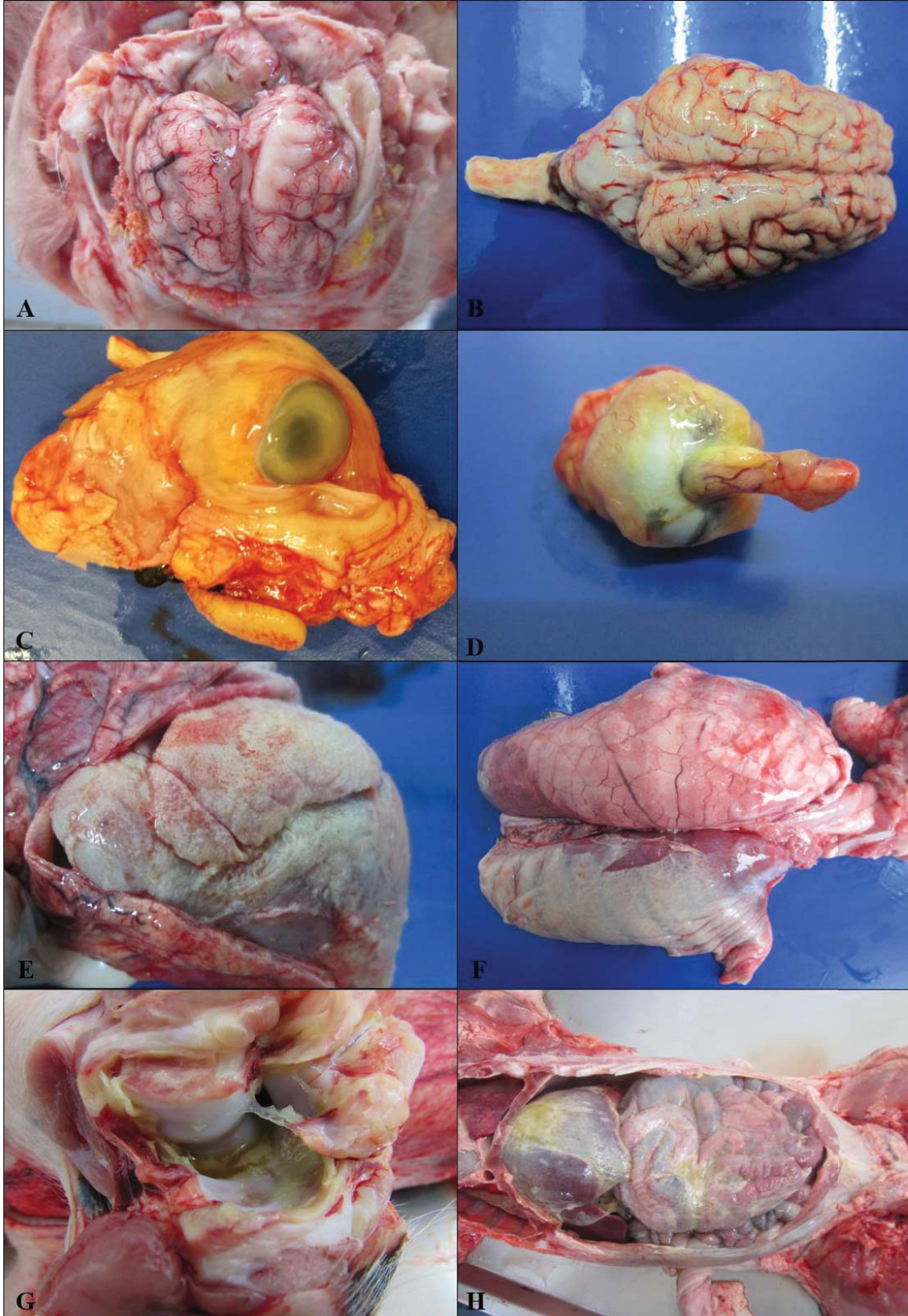




Figure 3.

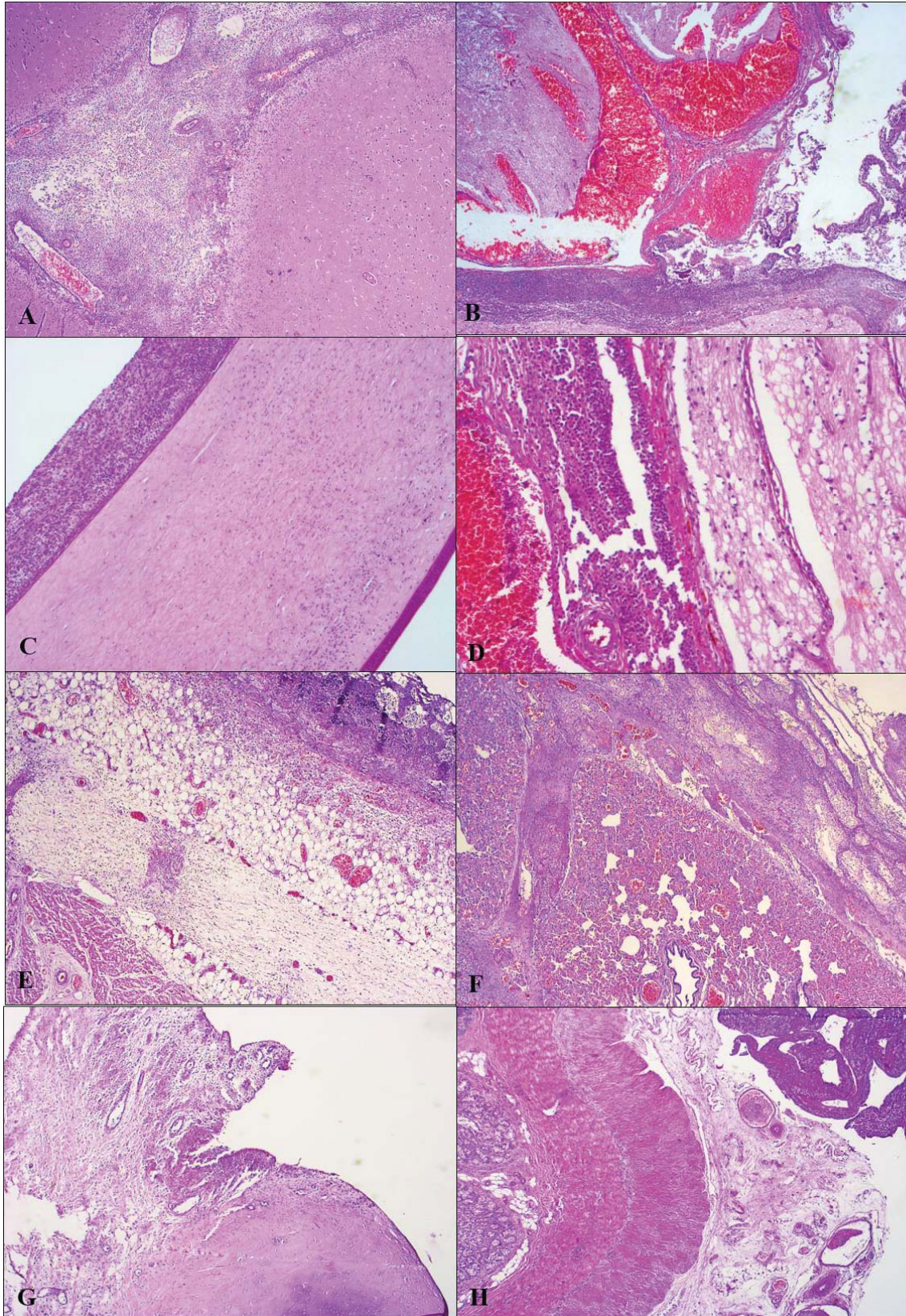
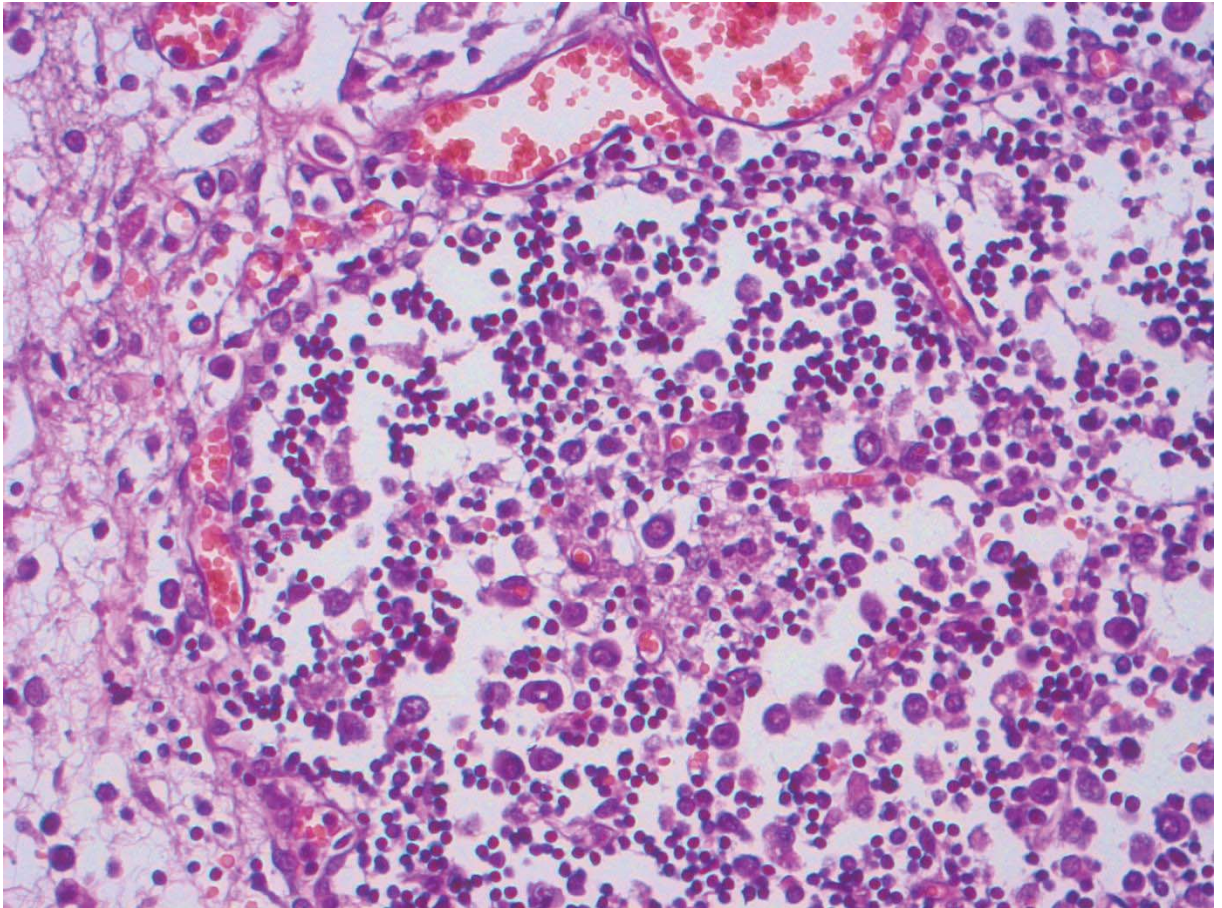




Figure 4.



#### 4. CONCLUSÕES

A condução deste estudo foi fundamental para reavaliar a classificação e definir a patogenicidade de uma cepa de *H. parasuis* considerada avirulenta. O estudo foi conduzido em leitões privados de colostro materno os quais constituem um excelente modelo para definição da patogenicidade do *H. parasuis*. Os estudos foram conduzidos observando-se critérios de biossegurança e atendendo aos requisitos mínimos destinados a determinar a patogenicidade de um micro-organismo. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- a) o SV 7 cepa 174 é capaz de provocar a Doença de Glässer em leitões privados de colostro. Assim, propomos sua reclassificação, de avirulento para virulento;
- b) o *H. parasuis* chega à corrente sanguínea antes de provocar lesão considerável no pulmão. Os sinais clínicos de artrite são observados antes dos sinais respiratórios.
- c) há um evidente tropismo do *H. parasuis* por fluídos que irrigam células complexas ou que necessitam de grande carga energética para seu funcionamento, como por exemplo líquido cefalorraquidiano, pericárdico e articular. É possível que estes líquidos dispõem de elementos necessários para o crescimento e sobrevivência do *H. parasuis*, como NAD, derivados da glicose e até mesmo ferro;
- d) até o momento sabia-se que o *H. parasuis* poderia aderir-se e invadir células endoteliais, como as células especializadas dos vasos cerebrais e ultrapassar a barreira hematoencefálica. Neste estudo observamos lesões nunca antes relatadas na Doença de Glässer, como endoftalmite fibrinossupurativa e aplasia tímica com intenso infiltrado macrofágico. Estes dois órgãos possuem barreiras hematógenas especializadas, como o cérebro, o que nos leva a crer que o *H. parasuis* tenha capacidade de atravessar toda e qualquer barreira órgão-sanguínea;

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio deste estudo fica evidente a variância patogênica entre os sorovares de *H. parasuis*, uma vez que, um sorovar tido como avirulento em tantos estudos diferentes, demonstrou que é capaz de provocar a Doença de Glässer e levar os animais a morte. Isso demonstra a capacidade deste microrganismo em expressar seus fatores de virulência em algum momento de sua existência, provavelmente como um mecanismo de sobrevivência. Esta capacidade de expressar fatores de virulência, ou ainda, fatores de sobrevivência como a expressão de TbpBs, sob ambientes hostis, é de fundamental importância, principalmente entre os membros da família *Pasteurellaceae*.

Ainda sobre o SV 7, previamente à infecção de animais privados de colostros com alta susceptibilidade imunológica, como neste estudo e no estudo de Guizzo *et al.*, 2018, cepas clínicas do SV 7 foram isoladas de sítios sistêmicos de lesões características da DG como artrite e poliserosites, provenientes de rebanhos suínos brasileiros, de diferentes estados.

A patogenia do *H. parasuis* continua pouco elucidada e ainda não há uma hipótese consolidada quanto a sua dispersão pelo organismo. Uma proposta futura é o estudo da composição bioquímica dos fluídos de predileção desse microrganismo, como os líquidos articulares, pericárdico e cefalorraquidiano. É necessária também uma avaliação da disposição do fator V da coagulação, o qual é fundamental para o crescimento desta bactéria e, a disponibilidade de ferro, a qual é necessária para sua sobrevivência. A disponibilidade de ferro poderá ser avaliada através da quantificação de proteínas como transferrinas ou lactoferrinas, presentes nestes líquidos. Além disso, uma avaliação imunológica (inata, humoral e celular) destes fluídos seria interessante para demonstrar se estes ambientes são imunologicamente favoráveis ao *H. parasuis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027 [Internet]. OECD; 2018 [cited 2018 Jul 26]. (OECD-FAO Agricultural Outlook). Available from: [https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2018-2027\\_agr\\_outlook-2018-en](https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2018-2027_agr_outlook-2018-en)
2. Sans P, Combris P. World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961-2011). *Meat Sci* [Internet]. 2015;109:106–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.012>
3. ABPA. Relatório Anual da ABPA. Assoc Bras Proteína Anim [Internet]. 2017;134p. Available from: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017>
4. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J Clin Microbiol*. 1992;30(4):862–5.
5. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *haemophilus* species. *J Med Microbiol*. 1969;2(1969):75–8.
6. Costa-Hurtado M, Aragon V. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. *Vet J* [Internet]. 2013;198(3):571–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.027>
7. Cuesta Gerveno JM, Risco Perez D, Goncalves Blanco P, Garcia Jimenez WL, Gil Molino M, Fernandez-Llario P, et al. Fatal infection due to *Haemophilus parasuis* in a young wild boar (*Sus scrofa*). *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2013;25(2):297–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512924>
8. Cerdà-Cuellar M, Naranjo JF, Verge A, Nofrarías M, Cortey M, Olvera A, et al. Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol*. 2010;145(3–4):315–20.
9. Nedbalcova K, Satran P, Jaglic Z, Ondriasova R, Kucerova Z. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review . *Vet Med (Praha)* [Internet]. 2006;51(5):168–79. Available from: <papers3://publication/uuid/3FE7861D-D3FB-4BDB-BFDA-4F57A6E3F696>
10. Turni C, Blackall PJ. Comparison of sampling sites and detection methods for *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J*. 2007;85(5):177–84.
11. Vanier G, Szczotka A, Friedl P, Lacouture S, Jacques M, Gottschalk M. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology*. 2006;152(1):135–42.
12. Zhao Z, Liu H, Zhang K, Xue Q, Chen K, Xue Y. Minimum dose , antigen content , and immunization duration of a trivalent vaccine of inactivated *Haemophilus parasuis* serovars 4 , 5 , and 12 against Glässer ' s disease in pigs. 2016;287–93.
13. Oh Y, Han K, Seo HW, Park C, Chae C. Program of vaccination and antibiotic treatment to control polyserositis caused by *Haemophilus parasuis* under field

- conditions. *Can J Vet Res.* 2013;77(3):183–90.
14. Frandoloso R, Martínez S, Rodríguez-ferri EF, Jose M, Pe C, Martínez-ferna 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 □. 2011;18(1):50–8.
  15. Palzer A, Austin-Busse RL, Ladinig A, Balka G, Zoels S, Ritzmann M. Histopathologic lesions in conventional pigs experimentally infected with Haemophilus parasuis serovar 5. *Tierarztl Prax Ausgabe G Grosstiere - Nutztiere.* 2015;43(2):91–6.
  16. Macedo N, Cheeran MCJ, Rovira A, Holtcamp A, Torremorell M. Effect of enrofloxacin on Haemophilus parasuis infection, disease and immune response. *Vet Microbiol [Internet].* 2017;199:91–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.032>
  17. Macedo N, Rovira A, Torremorell M. Haemophilus parasuis: Infection, immunity and enrofloxacin. *Vet Res.* 2015;46(1):1–6.
  18. Miani, M.; Lorensen, M. S.; Guizzo, J. A.; Espíndola, J. P.; Rodríguez-Ferri, E. F.; Gutiérrez-Martín, C. B.; Kreutz, L. C.; Frandoloso R. Antimicrobial susceptibility patterns of Brazilian Haemophilus parasuis 1 field isolates. 2013;0–34.
  19. Zanella JRC, Morés N, de Barcellos DESN. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. *Pesqui Agropecu Bras.* 2016;51(5):443–53.
  20. Turni C, Blackall PJ. Serovar profiling of Haemophilus parasuis on Australian farms by sampling live pigs. *Australian Vet J.* 2010;88(7):255–9.
  21. Frandoloso R, Martínez-Martínez S, Yubero S, Rodríguez-Ferri EF, Gutiérrez-Martín CB. New insights in cellular immune response in colostrum-deprived pigs after immunization with subunit and commercial vaccines against Glässer's disease. *Cell Immunol [Internet].* 2012;277(1–2):74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.05.010>
  22. Guizzo JA, Chaudhuri S, Prigol SR, Yu R, Dazzi CC, Balbinott N, et al. The amino acid selected for generating mutant TbpB antigens defective in binding transferrin can compromise the in vivo protective capacity. *Scientific Reports.* 2018;8:7372(January):1–13.
  23. Frandoloso R, Martínez-Martínez S, Calmettes C, Fegan J, Costa E, Curran D, et al. Nonbinding site-directed mutants of transferrin binding protein B exhibit enhanced immunogenicity and protective capabilities. *Infect Immun.* 2015;83(3):1030–8.
  24. Martínez-martínez S, Frandoloso R, Rodríguez-ferri E, García-iglesias M, Pérez-martínez C, Álvarez-estrada Á. Veterinary Immunology and Immunopathology A vaccine based on a mutant transferrin binding protein B of Haemophilus parasuis induces a strong T-helper 2 response and bacterial clearance after experimental infection. *Vet Immunol Immunopathol [Internet].* 2016;179:18–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.07.011>
  25. Wang Z, Zhao Q, Wei H, Wen X, Cao S. Prevalence and seroepidemiology of Haemophilus parasuis in Sichuan province , China. *PeerJ.* 2017;5:e3379 ht.



26. Brockmeier SL, Register KB, Kuehn JS, Nicholson TL, Loving CL, Bayles DO, et al. Virulence and Draft Genome Sequence Overview of Multiple Strains of the Swine Pathogen *Haemophilus parasuis*. PLoS One. 2014;9(8).
27. Moller K, Kilian M. V factor-dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract. J Clin Microbiol. 1990;28(12):2711–6.
28. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Diseases of Swine.
29. Zhang B, Tang C, Liao M, Yue H. Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors. Vet Microbiol [Internet]. 2014;168(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.027>
30. Xu C, Zhang L, Zhang B, Feng S, Zhou S, Li J, et al. Involvement of lipooligosaccharide heptose residues of *Haemophilus parasuis* SC096 strain in serum resistance, adhesion and invasion. Vet J [Internet]. 2013;195(2):200–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.017>
31. Ruiz A, Oliveira S, Torremorell M, Pijoan C. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1757.
32. Costa-Hurtado M, Ballester M, Galofré-Milà N, Darji A, Aragon V. VtaA8 and VtaA9 from *Haemophilus parasuis* delay phagocytosis by alveolar macrophages. Vet Res [Internet]. 2012;43(1):57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3462726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Curran DM, Adamiak PJ, Fegan JE, Qian C, Yu R hua, Schryvers AB. Sequence and structural diversity of transferrin receptors in Gram-negative porcine pathogens. Vaccine [Internet]. 2015;33(42):5700–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.097>
34. Olvera A, Ballester M, Nofrarías M, Sibila M, Aragon V. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. Vet Res. 2009;40(24):1–12.
35. Costa-Hurtado M, Olvera A, Martínez-Moliner V, Galofré-Milà N, Martínez P, Dominguez J, et al. Changes in macrophage phenotype after infection of pigs with *haemophilus parasuis* strains with different levels of virulence. Infect Immun. 2013;81(7):2327–33.
36. Galofré-Milà N, Correa-Fiz F, Lacouture S, Gottschalk M, Strutzberg-Minder K, Bensaid A, et al. A robust PCR for the differentiation of potential virulent strains of *Haemophilus parasuis*. BMC Vet Res. 2017;13(1):1–5.
37. Bello-Ortí B, Howell KJ, Tucker AW, Maskell DJ, Aragon V. Metatranscriptomics reveals metabolic adaptation and induction of virulence factors by *Haemophilus parasuis* during lung infection. Vet Res [Internet]. 2015;46(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-015-0225-9>
38. Cerdà-Cuellar M, Aragon V. Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine. Vet J. 2008;175(3):384–9.

39. Perry MB, MacLean LL, Gottschalk M, Aragon V, Vinogradov E. Structure of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from *Haemophilus parasuis* strains ER-6P (serovar 15) and Nagasaki (serovar 5). *Carbohydr Res* [Internet]. 2013;378:91–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.04.023>
40. Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis* : new trends on diagnosis , epidemiology and control. 2004;99:1–12.
41. Zhao Y, Wang Q, Li J, Lin X, Huang X, Fang B. Epidemiology of *Haemophilus parasuis* isolates from pigs in China using serotyping, antimicrobial susceptibility, biofilm formation and ERIC-PCR genotyping. *PeerJ* [Internet]. 2018;6:e5040. Available from: <https://peerj.com/articles/5040>
42. Rúbies X, Kielstein P, Costa L, Riera P, Artigas C, Espuña E. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet Microbiol*. 1999;66(3):245–8.
43. Solano-Aguilar GI, Pijoan C, Rapp-Gabrielson V, Collins J, Carvalho LF. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. *Am J Vet Res*. 1999;60(June 2016):81–87.
44. Bello-Orti B, Costa-Hurtado M, Martínez-Moliner V, Segalés J, Aragon V. Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract. *Vet Microbiol*. 2014;170(3–4):430–7.
45. Bouchet B, Vanier G, Jacques M, Gottschalk M. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells. *Vet Res* [Internet]. 2008;39(5):42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18387279>
46. Frandoloso R, Pivato M, Martínez-Martínez S, Rodríguez-Ferri EF, Carlos Kreutz L, Gutiérrez Martín CB. Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of AOC-45 porcine aorta endothelial cells. *BMC Vet Res*. 2013;9:1.
47. 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.
48. Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T. Pathologic Observation of Pigs Intranasally Inoculated with Serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* Using Immunoperoxidase Method. *J Vet Med Sci*. 1994;56 (4):639–44.
49. Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T. Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs. *J Vet Med Sci*. 1996;58 (6):559–61.
50. Amano H, Shibata M, Takahashi K, Sasaki Y. Effects on Endotoxin Pathogenicity in Pigs with Acute Septicemia of *Haemophilus parasuis* Infection. *J Vet Med Sci*. 1997;59(6):451–5.
51. Fablet C, Marois C, Dorenlor V, Eono F, Eveno E, Jolly JP, et al. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res Vet Sci* [Internet]. 2012;93(2):627–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.11.002>
52. Vahle JL. Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection in swine [Internet]. Iowa

- State University; 1996. Available from: <http://lib.dr.iastate.edu/rtd> Part
53. Fraile L, Mombarg M, Aragon V, Cerda M. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. 2010;142:387–93.
  54. Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Interaction of *Haemophilus parasuis* with Nasal and Tracheal Mucosa Following Intranasal Inoculation of Cesarean Derived Colostrum Deprived ( CDCD ) Swine. 1997;(Cdc):200–6.
  55. Oliveira S. Improving rate of success in isolating *Haemophilus parasuis* from clinical samples. *J Swine Heal Prod*. 2004;12(December):308–9.
  56. Frandoloso R, Martínez-Martínez S, Rodríguez-Ferri EF, Gutiérrez-Martín CB. Comparison of real-time PCR and culture isolation in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Lett Appl Microbiol*. 2012;54(2):149–52.
  57. Boerlin P, Poljak Z, Gallant J, Chalmers G, Nicholson V, Soltes GA, et al. Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* from sick and healthy pigs. *Vet Microbiol* [Internet]. 2013;167(3–4):459–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.028>
  58. Howell KJ, Peters SE, Wang J, Hernandez-garcia J, Weinert LA, Luan S, et al. Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3812–21.
  59. Lorenson MS, Miani M, Guizzo JA, Barasoul B, Martínez-Martínez S, Rodríguez-Ferri EF, et al. Altered indirect hemagglutination method for easy serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2017;69(1):15–21.
  60. Segales J, Domingo M, Solano GI, Pijoan C. Immunohistochemical Detection of *Haemophilus Parasuis* Serovar 5 in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues of Experimentally Infected Swine. *J Vet Diagnostic Investig* [Internet]. 1997;9(3):237–43. Available from: <http://vdi.sagepub.com/content/9/3/237.short>
  61. Ramos-Vara JA, Segalés J, Duran CO, et al. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. *Swine Heal Prod*. 1999;7(2):85–91.
  62. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* [Internet]. 2005;42(4):405–26. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.42-4-405>
  63. Martínez-Martínez S, Frandoloso R, Rodríguez-Ferri EF, García-Iglesias MJ, Pérez-Martínez C, Álvarez-Estrada Á, et al. A vaccine based on a mutant transferrin binding protein B of *Haemophilus parasuis* induces a strong T-helper 2 response and bacterial clearance after experimental infection. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2016;179:18–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.07.011>
  64. Martín de la Fuente AJ, Gutiérrez Martín CB, Pérez Martínez C, García Iglesias MJ, Tejerina F, Rodríguez Ferri EF. Effect of Different Vaccine Formulations on the Development of Glässer's Disease Induced in Pigs by Experimental *Haemophilus parasuis* Infection. *J Comp Pathol*. 2009;140(2–3):169–76.
  65. Olvera A, Pina S, Pérez-simó M, Aragón V, Segalés J, Bensaid A. Immunogenicity and

protection against *Haemophilus parasuis* infection after vaccination with recombinant virulence associated trimeric autotransporters (VtaA). *Vaccine*. 2011;29(15):2797–802.