

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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Haemophilus*
*parasuis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Monique Salette Lorenson

**Passo Fundo, RS, Brasil
2014**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Haemophilus
parasuis***

Monique Salete Lorensen

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

Orientador: Prof. Rafael Frandoloso

**Passo Fundo, RS, Brasil
2014**

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

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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Haemophilus
parasuis*.**

Elaborada por
Monique Salete Lorenson

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

Comissão Examinadora



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



Luiz Carlos Kreutz, Dr., UPF



Deniz Anziliero, Dr., UFSM

**Passo Fundo, RS, Brasil
2014**

CIP – Catalogação na Publicação

L868c Lorensen, Monique Salete

Caracterização fenotípica e determinação do perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados clínicos de *Haemophilus parasuis* / Monique Salete Lorensen. – 2014.
57 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Rafael Frandoloso.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2014.

1. Suíno – Doenças. 2. Estudos soroepidemiológicos.
3. Agentes antiinfeciosos. 4. Agentes antimicrobianos.
I. Frandoloso, Rafael, orientador. II. Título.

CDU: 636.4.09

Catalogação: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho, que é também um grande sonho que se realiza, não seria possível sem o apoio e colaboração de inúmeras pessoas. Por isso, gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela saúde física e mental, por guiar meus passos no caminho do bem.

Agradeço a concessão da bolsa de gratuidade concedida pela Universidade de Passo Fundo, e à Fapergs, fonte financiadora do projeto, que foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Professor Rafael Frandoloso, por todo o conhecimento e aprendizagem que tive durante o mestrado, pela amizade e pelas lições de perseverança e paixão pelo que se faz.

Aos bolsistas, João Antônio Guizzo, Márcia Bortoluzzi, Cristian Nied e Aislan Briskievicz, aos colegas de pesquisa Rafael Pandolfi e Michela Miani Colli, que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais amados, pelo amor incondicional, dedicação e educação que recebi e à minha irmã Letícia, que, mesmo de longe, sempre me apoiou.

Ao meu marido Maurício Guarienti, pelo amor, pelo apoio nas horas mais difíceis, por ter sido meu grande incentivador em todas as horas.

EPÍGRAFE

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”

Friedrich Nietzsche

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 <i>Haemophilus parasuis</i>	16
2.1.1 Morfologia, cultivo e características bioquímicas	16
2.1.2 Tipificação e classificação de <i>H. parasuis</i>	16
2.1.3 Virulência	18
2.1.4 Prevalência e distribuição mundial	20
2.2 DOENÇA DE GLÄSSER	21
2.2.1 Controle	22
3. CAPÍTULO 1. Isolamento e identificação molecular de <i>Haemophilus parasuis</i> na região sul do Brasil	23
Resumo.....	24
Introdução.....	25
Materiais e métodos.....	25
Resultados e discussão.....	26
Referências.....	29
4. CAPÍTULO 2. Antimicrobial susceptibility profile of Brazilian <i>Haemophilus parasuis</i> isolates	31
Abstract.....	32
Main text.....	33
Acknowledgements.....	37
References.....	38
5. CAPÍTULO 3. Padronização da técnica de hemaglutinação indireta modificada (HI_m) para a sorotipificação de isolados clínicos de <i>Haemophilus parasuis</i>	39
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Materiais e métodos.....	42
Resultados e discussão.....	44
Referências.....	51
6. CONCLUSÕES	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
8. REFERÊNCIAS	55

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. Representação dos pulmões analisados durante o estudo. A) Pulmão procedente de abatedouro, animal com aproximadamente 180 dias (fase de terminação). B) Pulmão procedente de leitão (40 dias), com sintomatologia clínica compatível com Doença de Glässer, fase de creche. As setas indicam pleurite. A forma “oval” indica a região cauterizada para coleta de material pulmonar..... 28

5. CAPÍTULO 3

- FIGURA 1. Desenvolvimento de antissoros específicos contra os sorotipos de referência de *H. parasuis* em ratas Wistar. A e B representam a cinética de anticorpos induzidos durante o protocolo de imunização. Os anticorpos foram avaliados mediante um ELISA indireto em três pontos do protocolo: antes da primeira imunização (dia 0), 14 dias após aplicação da primeira dose (dia 14) e 14 dias após a segunda dose (dia 28). 48
- FIGURA 2. Sorotipificação de *H. parasuis* através da HIm. Nas microplacas estão dispostos os 15 antissoros de referência (SV1 ao SV15) produzidos em ratas Wistar. Pode-se apreciar, claramente, que os antígenos do isolado clínico em teste, reagem fortemente (título de 1:1.280) contra o antissoro 12 (SV12), sendo este o sorotipo atribuído ao isolado. Reações cruzadas são advertidas contra os sorotipos 5 (1:10), 10 (1:10), 11 (1:40), 13 (1:10), 14 e 15 (1:40), no entanto, os título são expressivamente inferiores..... 50
- FIGURA 3. Isolado clínico não sorotipificável através da HIm. Observa-se que os antissoros SV11 e SV15 reagem com a mesma intensidade contra os antígenos extraídos do isolado clínico (título de 1:40), não sendo possível assignar um sorotipo específico ao isolado..... 50

LISTA DE TABELAS**4. CAPÍTULO 2**

TABELA 1.	Antibiotic susceptibility profile of 35 field isolates of <i>Haemophilus parasuis</i> .	36
-----------	---	----

5. CAPÍTULO 3

TABELA 1.	Resultados do teste de HIm com antissoros produzidos em ratas Wistar frente aos sorotipos de referência homólogos.....	49
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
DG	Doença de Glässer
HI	Hemaglutinação Indireta
HI _m	Hemaglutinação Indireta modificada
HPS	<i>Haemophilus parasuis</i>
IgA	Imunoglobulina A
KRG	Kielstein-Rapp-Gabrielson
LPS	Lipopolissacarídeo
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OMP	Proteína de membrana externa
PBS	Solução salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SPF	Livre de patógenos específicos
UPF	Universidade de Passo Fundo

RESUMO

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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Haemophilus*
*parasuis***

Autor: Monique Salette Lorenson
Orientador: Rafael Frandoloso
Passo Fundo, 19 de Setembro de 2014

Haemophilus parasuis (HPS), um pequeno bacilo Gram-negativo, membro da família *Pasteurellaceae*, é o agente etiológico da Doença de Glässer (DG), uma doença sistêmica caracterizada por intensa poliserosite e alta mortalidade dos animais acometidos. Considerada historicamente como uma doença de ocorrência esporádica, atualmente, devido as novas tendências da suinocultura moderna e com o estabelecimento de rebanhos com alto padrão sanitário, surtos da Doença de Glässer são cada vez mais frequentes, constituindo uma das principais doenças bacterianas emergentes da suinocultura mundial. Até o momento, o *H. parasuis* pode ser classificado em 15 sorotipos de referência e cada um apresenta perfil antigênico singular.

No Brasil, dados referentes a presença, distribuição, prevalência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana desse microrganismo são praticamente inexistentes, especialmente na região sul do país (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), onde a suinocultura representa uma importante atividade econômica. Motivado por este histórico, realizamos, neste trabalho, o isolamento e confirmação molecular de HPS, a partir de 78 amostras de pulmões com pleurite; avaliamos o perfil de resistência de 35 isolados de HPS frente a 10 antimicrobianos através da técnica de microdiluição em placa e, por último, propomos uma modificação na técnica de Hemaglutinação Indireta para a sorotipificação de HPS (HIm). Nossos resultados demonstraram uma alta prevalência (44.4%) de pulmões positivos para *H. parasuis* procedentes de leitões com quadro clínico compatível com DG. Todos os pulmões procedentes de suínos de terminação foram negativos para HPS, no entanto, 18 deles (54.5%) foram PCR positivos para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Com relação ao estudo do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados foram sensíveis ao ceftiofur, gentamicina e eritromicina. Foi observado um grau de resistência baixo a ampicilina (2.8%) e moderado para a penicilina (11.4%). Kanamicina e

lincomicina foram efetivas nas menores concentrações inibitórias mínimas (MICs) testadas e resultados semelhantes foram observados com relação a cefalotina. De forma contrária, bacitracina e sulfatiazol foram eficazes somente nas maiores MICs testadas. Por último e com relação a HIm, um alto título de anticorpos policlonais contra os 15 sorotipos de referência de HPS foram obtidos em ratas Wistar, inoculadas com os respectivos sorotipos. Quanto ao tratamento das hemácias de carneiro com ácido tânico (1:20.000), este procedimento permitiu uma melhor adsorção dos antígenos superficiais de *H. parasuis*, resultando numa técnica de HI que permite sorotipificar isolados clínicos com maior sensibilidade e especificidade.

Como conclusão, os resultados apresentados nesta dissertação demonstram a circulação de *H. parasuis* nas granjas de suínos da região sul do Brasil e apresenta um conjunto de drogas antimicrobianas efetivas para o tratamento da DG. Ainda, a HIm proposta neste estudo, apresenta sensibilidade e especificidade para a sorotipificação de HPS, tendo como principal vantagem em relação à HI clássica, maior estabilidade na adesão de antígenos superficiais de *H. parasuis*. Em conjunto, nossos resultados, inéditos na região sul, podem contribuir para o desenvolvimento de medidas preventivas efetivas para o controle da Doença de Glässer.

Palavras-chave: *Haemophilus parasuis*, Doença de Glässer, prevalência, sorotipificação, antimicrobianos

ABSTRACT

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

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL SENSITIVITY PROFILE OF CLINICAL ISOLATES OF *Haemophilus parasuis*

Author: Monique Salete Lorenson

Advisor: Rafael Frandoloso

Passo Fundo, 19 de Setembro de 2014

Haemophilus parasuis (HPS), a member of the *Pasteurellaceae*, is a small gram-negative bacillus that causes Glässer's disease (GD). This pathology is characterized by polyserositis and high mortality rate of infected animals. Modern approaches to swine industry and high sanitary herd conditions contribute to increase the incidence of GD. Up to now, HPS is classified in 15 serotypes of reference, each one having a distinct antigen profile. There are no data about HPS presences, distribution and prevalence in Brazil. This is true also for Southern Brazil (Rio Grande do Sul and Santa Catarina), where pig industry is an important economical source of income. Against this background, we isolated and analyzed 78 samples of swine lungs with pleuritis and confirmed HPS infection by molecular biology. We evaluated the resistance profile of 35 HPS isolates to 10 antimicrobials using the microdilution technique. We further propose a modified protocol for the indirect hemagglutination (IHA) in order to serotype HPS.

Our results demonstrate a high prevalence of HPS positive lung samples (44.4%) coming from piglets with signs suggestive of GD. All lungs from finishing pigs collected at slaughter were negative for HPS, however, 18 of them (54.5%) were PCR positive for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The susceptibility profile to antimicrobials revealed that all isolates were susceptible ceftiofur, gentamycin and erythromycin. A low degree of resistance was observed with ampicillin (2.8%) and moderate with penicillin (11.4%). Kanamycin and lincomycin were effective at the lowest minimal inhibitory concentration (MIC) used. Similar results were obtained with cefalotin. In contrast, bacitracin and sulfatiazol were effective with the highest MICs used.

For IHA we obtained from Wistar rats a high titration of polyclonal antibodies against all 15 serotypes. Treating lamb red blood cells with tannic acid (1:20.000) enables a better adhesion of HPS antigens, resulting in a more accurate technique to serotype clinical isolates.

In conclusion, the results presented here, demonstrate a high prevalence of *H. parasuis* in swine farms of southern Brazil and describe a set of effective antimicrobial drugs for the treatment of DG. Lastly, the HIm exhibited suitable sensitivity and specificity for serotyping of *H. parasuis*, and its main advantage over classical HI, is the greater capacity for adsorption of *H. parasuis* antigens.

Key words: *Haemophilus parasuis*, Glässer's Disease , prevalence, serotyping, antimicrobial

1. INTRODUÇÃO

Haemophilus parasuis, membro da família *Pasteurellaceae*, é um bacilo Gram-negativo, pleomórfico, fastidioso, cujo hospedeiro natural é o suíno. Esta espécie é muito heterogênea do ponto de vista patogênico, onde algumas cepas, descritas como não virulentas podem ser encontradas como comensais do trato respiratório superior de suínos jovens, enquanto outras, descritas como virulentas, podem, em condições apropriadas, migrar para os pulmões e causar pneumonia, como também alcançar a corrente circulatória provocando uma grave doença sistêmica, a Doença de Glässer, caracterizada por intensa poliserosite fibrinosa, poliartrite e meningite (1-3). Esse microrganismo pode ser classificado em 15 sorotipos fenotipicamente bem caracterizados (4), porém, um número significativo de isolados de campo não são tipificáveis mediante métodos sorológicos tradicionais (5, 6).

No passado, a DG era considerada esporádica e geralmente associada a condições de estresse (7), no entanto, nos últimos anos, vem-se observando um aumento de surtos desta doença, afetando, de maneira especial, granjas com sistema de produção intensivo e rebanhos com alto padrão sanitário (1). Mundialmente esta doença é responsável por significativas perdas econômicas, devido ao alto custo do tratamento com antibióticos e como consequência das altas taxas de morbidade e mortalidade dos animais acometidos (2, 3).

O uso de vacinas para a prevenção da DG é uma prática adotada em todos os países com suinocultura tecnificada, no entanto, o sucesso dessas vacinas é limitado ao sorotipo homólogo incluído na sua formulação (8), convertendo-se em um importante problema preventivo devido à alta heterogeneidade fenotípica entre os diferentes sorotipos de HPS (9).

Como consequência do insucesso das bacterinas comerciais, o uso de antimicrobianos é cada vez mais frequente para controlar surtos da DG, e, como resultado, o surgimento de cepas clínicas de HPS resistentes aos antibióticos normalmente utilizados na clínica de suínos começaram a emergir (10-12).

No Brasil, surtos da DG têm sido advertidos com frequência, no entanto, dados referentes à presença e distribuição desse microrganismo são ainda incipientes, existindo apenas dois estudos envolvendo isolados de HPS procedentes do estado do Paraná e das regiões sudeste e centro-oeste brasileira (13, 14), demonstrando a necessidade da realização de mais estudos com relação a este microrganismo.

Em base a este breve histórico, esta dissertação, estruturada em 3 capítulos na forma de artigos, apresenta importantes informações sobre isolados clínicos de *H. parasuis* obtidos em granjas da região Sul do Brasil.

O capítulo 1, intitulado “*Isolamento e identificação molecular de Haemophilus parasuis na região sul do Brasil*”, avalia de forma inédita a presença de *H. parasuis* em pulmões com intensa pleurite procedentes de suínos de terminação obtidos em abatedouros e de leitões de creche com sintomatologia clínica compatível com a Doença de Glässer. O capítulo 2, intitulado “*Antimicrobial susceptibility profile of Brazilian Haemophilus parasuis isolates*” descreve o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 35 isolados clínicos de *H. parasuis* a 10 antibióticos, sendo 5 deles normalmente utilizados na clínica de suínos. Por último, o capítulo 3, intitulado “*Padronização da técnica de hemaglutinação indireta modificada para sorotipificação de Haemophilus parasuis*”, descreve uma alteração na técnica de hemaglutinação indireta clássica, proporcionando melhores resultados de sorotipificação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Haemophilus parasuis*

2.1.1 Morfologia, cultivo e características bioquímicas

H. parasuis é uma pequena bactéria Gram negativa, microaerófila e de células pleomórficas (1, 2), pertencente ao gênero *Haemophilus* da família de γ -proteobactérias *Pasteurellaceae* (3), que podem apresentar-se morfológicamente como pequenos bacilos ou cocobacilos. Seu cultivo é laborioso por suas exigências nutricionais, sendo necessário para o seu crescimento, a utilização de meios com Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD), também conhecido como fator V da coagulação do sangue. Alternativamente, como fonte de NAD pode-se utilizar o ágar sangue de carneiro com uma estria central de *Staphylococcus aureus*, que produz o fator V durante seu crescimento. Desta forma, o *H. parasuis* forma colônias ao redor da estria deste microrganismo, gerando um fenômeno chamado de satelitismo (1, 2, 4). A temperatura ótima para o seu crescimento é de 37°C e as colônias produzidas depois de 24 a 48 horas em atmosfera microaerófila, apresentam um aspecto translúcido, tamanho pequeno (aproximadamente 0,12 mm de diâmetro) e não provocam hemólise em ágar sangue (1).

A caracterização dessa espécie pode ser feita através de provas bioquímicas, tendo o seguinte perfil: urease negativo, catalase positivo, fermenta açúcares como a glicose, sacarose, galactose, manose e frutose. Não utiliza lactose, manitol e xilose. Negativo para a produção de indol e oxidase, e não reduz nitrato a nitritos (5).

Por ser uma bactéria exigente e de crescimento lento, o desenvolvimento e a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) representou um grande avanço na identificação de *H. parasuis* e, como um todo, as técnicas de biologia molecular têm contribuído significativamente para a tipificação deste microrganismo.

2.1.2 Tipificação e classificação de *H. parasuis*

Muitos estudos de sorotipificação foram realizados, confirmando a existência de uma grande heterogeneidade entre as cepas de *H. parasuis*. Baseando-se em um sistema de precipitação de extratos antigênicos, Bakos et al. (6) descreveram pela primeira vez a existência de quatro sorotipos diferentes, os quais foram denominados como A, B, C e D. Posteriormente, os sistemas de classificação foram sendo modificados e o número de sorotipos aumentando (7, 8),

até se chegar ao sistema de classificação atual proposto por Kielstein & Rapp-Gabrielsen, em 1992 (2). Estes autores propuseram um esquema uniforme para designar estes sorotipos, método denominado Kielstein-Rapp-Gabrielsen (KRG). Nesta técnica a sorotipificação é realizada por imunodifusão de antígenos autoclavados relacionados a polissacarídeos presentes na cápsula celular ou na membrana externa do microrganismo. Através deste esquema, as amostras são classificadas em sorotipos denominados de 1 a 15. Mesmo com o sucesso do método KRG, existe uma porcentagem relativamente grande de isolados que não são tipificáveis, sugerindo que podem existir outros sorotipos ainda não conhecidos. Apesar de ser o método padrão mundialmente aceito, a sorotipificação por imunodifusão é considerada um método impreciso e um número importante de cepas (mais de 30%), identificadas como *H. parasuis*, não se tipificam devido a diversas razões, como, por exemplo, a enorme variabilidade das cepas, a escassa imunogenicidade de alguns sorotipos e um elevado número de reações cruzadas observadas com as técnicas baseadas em anticorpos policlonais (4).

Em 2003, foi proposto por Del Rio et al., uma metodologia alternativa para a sorotipificação, baseada na hemaglutinação indireta. De acordo com estes autores, em um estudo envolvendo 67 cepas de HPS, 62% dos isolados foram tipificáveis através da imunodifusão em gel de agar, por outro lado, através da HI, 80% puderam ser tipificados, ressaltando a especificidade dessa técnica (9). Outros autores, utilizando a mesma metodologia, obtiveram resultados similares, corroborando que a HI apresenta-se como um método mais específico, com menos reações cruzadas e, em conjunto, mais adequado para a sorotipificação de *H. parasuis* (10-13).

Como alternativa aos métodos sorológicos, algumas técnicas moleculares desenvolvidas contribuem para a tipificação de isolados clínicos de *H. parasuis*. A técnica de eletroforese de enzimas multilocus (MEE) foi utilizada em 1992 por Rapp-Gabrielson & Gabrielson (14) para analisar a diversidade entre os sorotipos de referência e isolados clínicos de suínos australianos, demonstrando uma considerável heterogeneidade nesta espécie bacteriana. Mais tarde, Blackall et al. (15), utilizando a mesma técnica, descreveram 34 padrões de eletroforese entre isolados da Austrália, onde, com exceção de um isolado, os 33 restantes se classificaram em dois grupos, A e B. O grupo A estava formado por duas cepas de referência do sorotipo 5, por isolados de campo dos sorotipos 4, 5 e 13, e por algumas cepas não tipificáveis. O grupo B estava constituído por isolados de campo dos sorotipos 1, 2, 7, 9, 10, 13 e por as cepas de referência dos sorotipos 1, 2,

3, 4, 8 e 9. Este trabalho demonstrou uma grande heterogeneidade existente entre as cepas de *H. parasuis*, indicando que o sorotipo não é um marcador epidemiológico e de virulência preciso e confiável.

Devido ao fato de existirem muitos isolados não tipificáveis de *H. parasuis* pelos métodos sorológicos tradicionais, Smart et al. (41) utilizaram a técnica de REF (*restriction endonuclease fingerprinting*) com a enzima de restrição *Bam*HI para tipificar cepas nasais de suínos procedentes de granjas SPF e convencionais, comparando com padrões obtidos de cepas de referência e de isolados clínicos da DG. Este estudo permitiu reconhecer 34 padrões REF únicos em um total de 69 isolados, e, os 35 isolados restantes se agruparam em 13 grupos REF, confirmado o alto grau de heterogeneidade dos sorotipos prevalentes.

A técnica de ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence*) permite a amplificação de sequências intergênicas que se repetem em enterobactérias pela PCR. Esta técnica permite determinar a variabilidade genética entre diferentes isolados e os padrões de DNA obtidos com a ERIC-PCR são menos complexos que os gerados pela REF-PCR. Rafiee et al. (16) utilizaram esta técnica para analisar o perfil dos 15 sorotipos de referência de *H. parasuis* e de 14 isolados de campo australianos e, os resultados, permitiram agrupar os 15 sorotipos de referência em um único padrão ERIC-PCR. A maioria das cepas de *H. parasuis* com genótipo similar pertenciam ao mesmo sorotipo, indicando que o genótipo de um isolado é um bom indicador de sorotipo. Macedo et al. (37), ao utilizarem esta técnica em estudos de diversidade genética de isolados de *H. parasuis*, ressaltam a importância deste método na realização de estudos epidemiológicos e também na seleção de cepas para a formulação de vacinas autógenas.

Por último, a técnica de PCR-RFLP sobre o gene *tbpA* de *H. parasuis*, proposta por de la Puente-Redondo et al. (43), permite a tipificação de cepas deste microrganismo, sendo uma ferramenta útil para desvendar possíveis relações entre as causas de surtos da Doença de Glässer nos rebanhos suínos.

2.1.3 Virulência

Do ponto de vista patogênico, é bem estabelecido que somente os sorotipos virulentos apresentam capacidade de causar doença sistêmica e, nesse sentido, o sorotipo tem sido tradicionalmente usado como indicador de virulência. Sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 foram classificados como altamente virulentos; sorotipos 2, 4 e 15 como moderadamente virulentos e os

sorotipos restantes, 3, 6, 7, 8, 9 e 11 como não virulentos (2), porém os fatores de virulência específicos do agente ainda são pouco conhecidos.

Nos últimos anos, muitos estudos foram realizados com o objetivo de compreender melhor os fatores de virulência presentes em *H. parasuis* e o desenvolvimento de novas técnicas de manipulação genética, estão permitindo identificar genes envolvidos na transcrição de moléculas associadas aos mecanismos de patogênese deste microrganismo (17). Algumas cepas de *H. parasuis*, possuem diversos mecanismos envolvidos no estabelecimento da infecção, evasão do sistema imunológico e produção de danos nos tecidos alvo da infecção.

A imunoglobulina A (IgA) constitui a primeira molécula específica utilizada para a neutralização dos patógenos associados às mucosas e a produção de proteases que degradam IgA desempenham um importante papel na evasão da resposta imune do hospedeiro. Assim como em alguns patógenos humanos, incluindo *Haemophilus influenzae*, essa atividade proteolítica é encontrada em cepas de *H. parasuis*, sugerindo que este mecanismo possa ser utilizado pelo patógeno para superar a resposta imune específica de mucosa do hospedeiro e, conseqüentemente, invadir órgãos sistêmicos (18). Outro importante mecanismo de evasão a ser destacado, é a capacidade de cepas virulentas de *H. parasuis* de evitarem o processo de fagocitose dos macrófagos alveolares, os quais constituem a principal linha de defesa contra os patógenos pulmonares, sendo as proteínas *vtaA8*, *vtaA9* e a cápsula bacteriana, os principais fatores de virulência envolvidos neste processo (19).

Embora os mecanismos específicos utilizados por *H. parasuis* para alcançar a corrente sanguínea não sejam totalmente conhecidos, a capacidade de invadir células epiteliais e endoteliais mostrada por cepas virulentas, demonstra ser um importante passo para a infecção sistêmica (20-23). No sangue, cepas de *H. parasuis* associadas à produção de doença sistêmica, podem resistir à atividade bactericida do sistema do complemento, no entanto, cepas isoladas da cavidade nasal de suínos saudáveis não possuem esta capacidade (24). Recentes estudos de manipulação genética indicam que os antígenos da superfície de *H. parasuis* OmpP2, heptosiltransferases (I, II e III) de LOS, GalU e GalE estão envolvidos no processo de resistência ao soro (25).

Fatores de virulência de membros da família *Pasteurellaceae* que colonizam o trato respiratório superior de suínos também estão presentes em *H. parasuis*, incluindo as proteínas de membrana externa (Omps), lipooligossacarídeos (LOS), fímbrias, neuraminidase, proteínas de

ligação à transferrina (2). Entre as Omps, destaca-se a OmpP2, uma porina abundante presente na membrana externa de *H. parasuis*, que participa na aderência, invasão, resistência ao soro e estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios no hospedeiro (25).

Neste patógeno a diferença de virulência entre os 15 sorotipos são marcantes, existindo desde cepas altamente virulentas até cepas não virulentas. Estudos demonstram diferenças genéticas entre essas cepas, porém muitos mecanismos envolvidos na produção da doença ainda não estão esclarecidos. No entanto, torna-se evidente que a capacidade de evadir os mecanismos de defesa são fundamentais para o estabelecimento da infecção, multiplicação e disseminação do patógeno no hospedeiro, produzindo a Doença de Glässer.

2.1.4 Prevalência e distribuição mundial

O *Haemophilus parasuis* está distribuído mundialmente e a prevalência dos sorotipos varia de acordo com a localização geográfica. Os sorotipos de maior prevalência mundial são 4, 5 e 13, os quais são classificados como de virulência moderada a alta e estão, portanto, envolvidos em quadros de poliserosite (9).

Na América do Norte, Austrália e Japão, os sorotipos 4, 5 e 13 são os mais frequentes (2, 10, 26), coincidindo com dados observados na Alemanha (2). Na Espanha, um estudo publicado em 1999, onde 174 amostras foram sorotipificadas, os sorotipos mais frequentes foram o 5 (18,4%), o 4 (16%) o 2 (9,2%) e o 13 (8%) (27). Resultados semelhantes também foram encontrados na China, em 2012, onde os sorotipos 4 e 5 foram os mais prevalentes, com 23% e 17% respectivamente, seguidos pelos sorotipos 2 (8%), 15 (7%), 13 (6%) e 12 (5%), e, 20% das cepas não foram tipificáveis (35). Na Itália, o sorotipo 4 apresenta-se como o mais prevalente (24,5%), seguido pelo 13 (19,8%) e 5 (11,3%) (28).

No Brasil, as pesquisas relacionadas com *H. parasuis* ainda são escassas e, portanto, desconhece-se a extensão de sua ocorrência e de sua prevalência nos rebanhos (29). Um estudo realizado por Macêdo et al. (30), em cinco estados brasileiros (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina), demonstrou a presença dos sorotipos 1, 2, 4, 5, 6, 9, 12 e 14, onde o 4 (15,9%) foi o mais prevalente, e, observou-se ainda, uma alta prevalência de isolados não tipificáveis (60,3%). Em outro estudo (31), realizado com isolados provenientes da mesma região brasileira, demonstrou-se novamente que o sorotipo 4 foi o mais prevalente (26,1%), seguido pelos sorotipos 5 (17,4%), 14 (8,7%), 13 (4,4%) e 2 (4,4%), sendo 37% de

cepas não tipificáveis, ressaltando a heterogeneidade sorotípica das cepas presentes nos rebanhos e também a alta prevalência de isolados não tipificáveis por métodos sorológicos tradicionais.

2.2 DOENÇA DE GLÄSSER

Em 1910 Glässer relatou pela primeira vez a associação de um bastonete Gram-negativo com quadros de pleurite serofibrinosa, pericardite, peritonite, artrite e meningite em suínos (32). Esta enfermidade tem sido diagnosticada em praticamente todo o mundo, afetando rebanhos suínos e gerando grandes perdas econômicas devido ao alto custo dos tratamentos com antibióticos e a mortalidade de animais na forma aguda da doença, representando, na atualidade, um dos principais problemas emergentes da suinocultura mundial (33). Surtos ocorridos na Europa, em países como a Espanha, Reino Unido (22) e também na China (34) confirmam e destacam o *H. parasuis* como um patógeno de importância econômica relevante.

Pelo fato de ser um microrganismo que faz parte da microbiota respiratória normal dos suínos, pensava-se que este fosse um patógeno oportunista, afetando somente animais imunocomprometidos ou em situações de estresse, como desmame precoce, transporte e manejo inadequados ou na presença de outros patógenos respiratórios (24, 33). No entanto, desde o estabelecimento de rebanhos livres de patógenos específicos (SPF) ou com alto padrão sanitário, ocorreu um aumento significativo da doença nos animais em todas as fases de produção, principalmente quando animais de diferentes origens são misturados, ou quando ocorre a introdução de uma nova cepa para qual os animais não possuam imunidade específica (4).

Em termos gerais, microrganismos virulentos presentes no trato respiratório superior, podem produzir otites ou até mesmo colonizar áreas mais profundas, ocasionando faringites e pneumonia. Se os microrganismos alcançarem a corrente sanguínea, poderão causar septicemia, repercutindo com um quadro de poliserosites e poliartrites, típico da Doença de Glässer, podendo ocasionar a morte do animal acometido (35).

Entre os numerosos sinais clínicos associados à Doença de Glässer, pode-se destacar a perda de apetite, anorexia, sinais neurológicos, como tremores e incoordenação motora, alterações nas articulações, problemas respiratórios, cianose, febre, convulsão, claudicação, abortos, decúbito lateral e morte súbita. Na necropsia, pode ser observada a presença de exsudato fibrinoso, serofibrinoso ou purulento nas membranas serosas afetadas, condizente com um quadro de artrite, pleurite, pericardite, meningite e pneumonia. Sugere-se que endotoxinas derivadas do

microrganismo induzam a coagulação intravascular disseminada, resultando na formação de microtrombos em diversos órgãos (32, 36). Estas lesões podem ocorrer em várias combinações, ou isoladamente. Nos casos crônicos observados especialmente em abatedouros, há aderências nas serosas torácicas e abdominais, com a presença de conteúdo fibrino-purulento nas articulações (37).

2.2.1 Controle

O controle de surtos da Doença de Glässer pode ser feito através da vacinação dos rebanhos. Atualmente, estão disponíveis no mercado, diversas vacinas bacterinas comerciais, no entanto, devido à diversidade dos sorotipos e ao grande número de isolados não tipificáveis de *H. parasuis*, a eficácia destas é limitada (38). Estas vacinas geralmente conferem proteção homóloga contra determinado sorotipo, e os resultados de proteção heteróloga entre os sorotipos de *H. parasuis* são praticamente inexistentes. Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver vacinas mais eficazes, que possam conferir proteção heteróloga efetiva contra os diferentes sorotipos de *H. parasuis* (39, 40).

Além das vacinas, a utilização de antimicrobianos também é importante no controle e tratamento da doença, podendo ser utilizado diversas drogas, como penicilinas, cefalosporinas e quinolonas (37). Os antimicrobianos também podem ser utilizados de forma preventiva e imediatamente após o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos da doença. A correção dos fatores de risco associado a protocolos sanitários e de biossegurança nos rebanhos são essenciais para minimizar perdas econômicas resultantes desta enfermidade.

3. CAPÍTULO 1

Isolamento e identificação molecular de *Haemophilus parasuis* na região sul do Brasil

Monique Salete Lorenson¹, Michela Miani¹, João Antônio Guizzo¹, Luiz Carlos Kreutz¹, Elias Fernando Rodríguez Ferri², César B. Gutiérrez Martín², Rafael Frandoloso^{1*}

(Artigo que será submetido ao periódico *Research in Veterinary Science*)

¹ Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Brasil

² Department of Animal Health, University of León, Spain

*Corresponding author: Rafael Frandoloso, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus I, Bairro São José. CEP 99052-100. Telefone: +55 54 3316 8485; Fax: +55 54 3316 8163. E-mail: rfran@upf.br

Resumo

O *Haemophilus parasuis* é um pequeno bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Pasteurellaceae*, que pode ser encontrado como comensal no trato respiratório superior de suínos. É o agente etiológico da Doença de Glässer (DG), uma enfermidade que produz significativas perdas econômicas para suinocultura mundial. No Brasil, os dados referentes a presença e a distribuição desse microrganismo são escassos, especialmente no sul do país, onde a suinocultura representa uma importante atividade econômica. O presente trabalho avaliou a presença de *H. parasuis* em 78 pulmões, sendo 33 deles procedentes de animais de terminação (abatedouros) e 45 de leitões (fase de creche) com suspeita clínica de DG. Após a coleta do material pulmonar e isolamento bacteriano, as colônias suspeitas foram confirmadas mediante uma reação em cadeia da polimerase (PCR) 16S de *H. parasuis*. Dos 33 pulmões de animais com pleurite, provenientes de suínos de terminação, 18 (54,5%) apresentaram colônias morfológicamente compatíveis com *H. parasuis*, porém negativas molecularmente. Estas colônias foram confirmadas como sendo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, mediante PCR para o gene *tbpA*. Por outro lado, 20 (44,4%) dos 45 pulmões oriundos de leitões jovens, com aproximadamente 40 dias de idade, foram positivas para *H. parasuis*. Nossos resultados colocam de manifesto uma alta prevalência de isolados de *H. parasuis* pulmonares obtidos de animais jovens com sintomatologia de DG, confirmando a presença desta enfermidade nas granjas com produção intensiva de suínos na região sul do Brasil. Por outro lado, a intensa pleurite observada nos animais de terminação, parece não estar relacionada com *H. parasuis* e sim com *A. pleuropneumoniae*.

Palavras-chave: *Haemophilus parasuis*, Doença de Glässer, pleurite, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, isolamento.

Introdução

O *Haemophilus parasuis* (HPS) é um bacilo Gram-negativo pequeno e pleomórfico, bem adaptado ao microambiente do trato respiratório superior dos suínos. Este microrganismo é o agente etiológico da Doença de Glässer (DG), uma doença sistêmica associada ao estresse de suínos jovens (1).

Clinicamente, animais acometidos pelos sorotipos virulentos de HPS apresentam intensa poliserosite, artrite e meningite (2), produzindo importantes perdas econômicas para a suinocultura (3). Considerada historicamente como uma doença de ocorrência esporádica, atualmente, a DG é uma das mais prevalentes e importantes patologias bacterianas de interesse para a suinocultura. Infecções causadas por HPS são notificadas em muitos países com produção intensiva de suínos (4-6) e, a causa, está diretamente associada às características do atual sistema de produção desses animais (7).

Embora HPS possa ser classificado em 15 sorotipos bem definidos (8), diferentes estudos reportam um número significativo de cepas clínicas não tipificáveis mediante os métodos clássicos (6, 9), indicando a existência de mais do que 15 sorotipos (10), sugerindo a necessidade de revisar a atual classificação fenotípica desse microrganismo.

No Brasil, estudos relacionados com o HPS e a DG são ainda incipientes e, nesse contexto, não existem dados sobre a presença de HPS na região Sul do país (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), onde a suinocultura representa uma das mais importantes atividades econômicas. Neste trabalho, analisamos a presença de *H. parasuis* em pulmões com intensa pleurite procedentes de suínos de terminação coletados em abatedouro e de leitões com clínica compatível com Doença de Glässer.

Materiais e métodos

Isolamento de *H. parasuis*

Um total de 78 pulmões com intensa pleurite, sendo 33 procedentes de abatedouros e 45 de leitões com suspeita clínica de Doença de Glässer, foram analisados. Após cauterizar a superfície do parênquima pulmonar com o auxílio de uma espátula flambada, um swab estéril foi introduzido no centro da área cauterizada com o objetivo de coletar material pulmonar (Fig. 1). Em seguida, as amostras foram semeadas por esgotamento em placas de ágar chocolate

suplementadas com 2.5 mg/ml de glicose (Sigma) e 72 µg/ml de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma) e incubadas a 37°C durante 24 - 36 horas, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. As colônias com características macroscópicas típicas e constituídas por pequenos bacilos Gram-negativos (coloração de Gram) foram selecionadas para confirmação molecular.

Confirmação molecular

A confirmação molecular foi realizada mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a sequência do gene 16S de HPS (11). Brevemente, o cultivo bacteriano foi coletado com o auxílio de uma alça de inoculação (10µl), ressuspendido em 200 µl de água livre de DNAsas (Sigma) e lisado mediante fervura durante 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA extraído foi diluído 1:100 e 5 µl foi utilizado como amostra na reação de PCR (GoTaq® Green Master Mix – Promega) contendo a combinação de oligonucleotídeos descrita por Oliveira et al. (2001). Após conclusão do protocolo de amplificação (11), os produtos da PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (1%) e corados com o agente intercalante GelRed (Biotium). O DNA foi visualizado através da fluorescência UV.

Resultados e discussão

O *H. parasuis* é considerado um dos mais importantes patógenos bacterianos emergentes do rebanho suíno. Clinicamente, desencadeia a Doença de Glässer, uma doença extremamente invasiva, incompatível com a vida dos animais e, que produz importantes perdas econômicas para o setor. Estudos epidemiológicos acerca desse microrganismo no Brasil são ainda incipientes e particularmente, com relação à região sul, simplesmente não existem.

Neste estudo, avaliamos mediante isolamento microbiológico clássico, a presença de HPS em pulmões com intensa pleurite (Fig. 1), procedentes de suínos de terminação (180 dias de idade) e obtidos em abatedouros. Dos 33 pulmões analisados, 18 (54,5%) apresentavam uma alta contagem de pequenos bacilos Gram-negativos, morfológicamente compatíveis com HPS, no entanto, negativo molecularmente (PCR sobre o gene 16S). Com o objetivo de identificar a suspeita microbiológica com relação a este microrganismo, realizamos uma PCR para o gene *tbpA*, utilizando o protocolo descrito por de la Puente-Redondo et al. (12). Este sistema está desenhado sobre regiões homólogas do gene *tbpA* presentes nos genomas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis*, no entanto, após amplificação, são gerados produtos

de PCR com tamanhos diferentes, 2.7 Kb e 1.9 Kb, respectivamente. Como resultados, todos os microrganismos suspeitos foram PCR positivos para *A. pleuropneumoniae* (App).

De maneira contrária, 20 dos 45 pulmões procedentes de leitões jovens, com aproximadamente 40 dias de idade e com quadro clínico compatível com a DG, foram positivos para HPS, destacando uma prevalência de 44,4% de positividade. Todos os animais com intensa pleurite apresentavam também pericardite-fibrinosa, e, destes, 77,7% (35 amostras) foram positivas para HPS (dados não apresentados neste capítulo).

Apesar de HPS poder causar infecções em animais de qualquer idade (7), observamos neste estudo, duas tendências com relação ao isolamento de HPS a partir de pulmões com pleurite. Animais oriundos da fase final de terminação, apresentaram uma prevalência de mais de 50% com relação a presença de App no parênquima pulmonar e foram 100% negativos para HPS. Este resultado sugere que a pleurite e demais lesões patológicas (pneumonia) observadas no tecido pulmonar, foram causadas como consequência de uma infecção por App. Este patógeno, também pertencente à família *Pasteurellaceae*, clinicamente, produz a pleuropneumonia suína, uma doença respiratória altamente contagiosa (13), que acomete principalmente suínos com 12 ou mais semanas de vida (14), representando um importante problema respiratório e presente nos rebanhos do sul do país, conforme destacado neste estudo.

Por outro lado, a não detecção de HPS nos pulmões coletados em frigoríficos, poderia estar relacionado com a metodologia utilizada para o isolamento desse microrganismo. Nesse sentido, a incubação *overnight* de fragmentos de tecido pulmonar em meio líquido suplementado e a posterior semeadura em meio sólido, poderia ter aumentado as chances de isolamento de HPS (15). No entanto, como observado neste estudo, o isolamento em cultivo puro e com alto número de colônias de App, reduz a possibilidade da participação de HPS no desenvolvimento das lesões observadas nos pulmões procedentes dos animais abatidos no frigorífico. Ainda, podemos observar uma relação positiva entre a idade e susceptibilidade dos animais aos dois patógenos detectados.

Nesse sentido, HPS normalmente acomete animais jovens com idades de 4 a 6 semanas (16), produzindo lesões caracterizadas por um intenso exsudato fibrinoso sobre a pleura, pericárdio, peritônio, meninges e articulações (17), podendo também ser isolado de pulmões de com pneumonia (18). O alto número de pulmões positivos para HPS detectados neste estudo confirma a presença da DG nas granjas com produção intensiva de suínos da região sul do Brasil

e chama a atenção para a circulação de cepas virulentas de HPS, hipoteticamente diferentes das cepas presentes nas bacterinas comerciais. Destacamos esta informação pelo fato de que os 20 HPS isolados neste estudo foram obtidos de leitões procedentes de granjas que vacinam 100% do rebanho para *H. parasuis*. Esta informação é particularmente importante porque destaca o baixo potencial de proteção conferido pelas bacterinas comercial frente as cepas de HPS que estão circulando nas granjas brasileiras. Também, destaca a diversidade fenotípica entre os diferentes sorotipos deste microrganismo e, sugere o desenvolvimento de pesquisas na área da vacinologia para a obtenção de vacinas com capacidade de proteção heteróloga frente aos sorotipos virulentos deste importante patógeno bacteriano.

Neste estudo, demonstramos uma alta prevalência de HPS em casos suspeitos de Doença de Glässer na região sul do Brasil. Também, demonstramos que pulmões com lesões de pleurite e pneumonia procedentes de animais de terminação não são indicados para o isolamento de HPS. Futuros estudos deverão ser realizados no sentido de caracterizar o perfil sorotípico das cepas clínicas de *H. parasuis* isoladas.

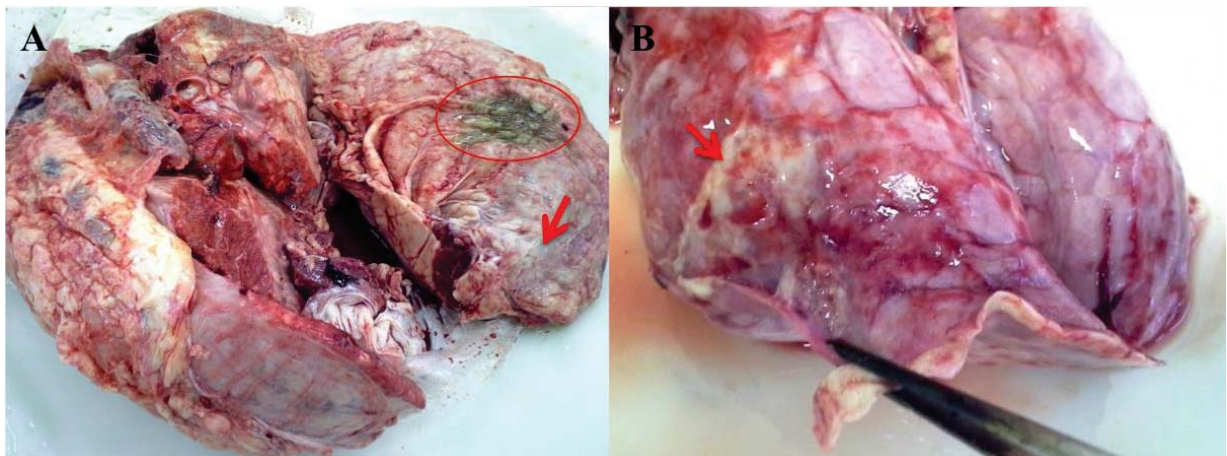


Figura 1. Representação dos pulmões analisados durante o estudo. A) Pulmão procedente de abatedouro, animal com aproximadamente 180 dias (fase de terminação). B) Pulmão procedente de leitão (40 dias), com sintomatologia clínica compatível com Doença de Glässer, fase de creche. As setas indicam pleurite. A forma “oval” indica a região cauterizada para coleta de material pulmonar.

Referências

1. Smart NL, Miniats OP, MacInnes JJ. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Canadian Journal Veterinary Research*, 1988;52(3):319-24.
2. Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary Microbiology*, 2004;99(1):1-12.
3. Nedbalcova K, Satran P, Jaglic Z, Ondriasova R, Kucerova Z. *Haemophilus parasuis* and Glasser's disease in pigs: a review. *Veterinary Medicine*, 2006;51(5):168-79.
4. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Angen O. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary Microbiology*, 2004;101(2):143-6.
5. de la Fuente AJ, Tucker AW, Navas J, Blanco M, Morris SJ, Gutierrez-Martin CB. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology*, 2007;120(1-2):184-91.
6. Turni C, Blackall PJ. Serovar profiling of *Haemophilus parasuis* on Australian farms by sampling live pigs. *Australian Veterinary Journal*, 2010;88(7):255-9.
7. Rapp-Gabrielson VJ, Oliveira SR, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Disease of Swine*. Ames, Iowa: Blacwell Publishing; 2006. p. 681-90.
8. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992;30(4):862-5.
9. Castilla KS, de Gobbi DD, Moreno LZ, Paixao R, Coutinho TA, dos Santos JL, et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. *Research in Veterinary Science*, 2012;92(3):366-71.
10. Rafiee M, Blackall PJ. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Australian Veterinary Journal*, 2000;78(3):172-4.
11. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001;13(6):495-501.
12. de la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutierrez-Martin CB, Mendez JN, Rodriguez Ferri EF. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Research in Microbiology*, 2000;151(8):669-81.

13. Gottschalk M, Taylor DJ. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 2006.
14. Cruijssen T, van Leengoed LA, Kamp EM, Bartelse A, Korevaar A, Verheijden JH. Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology*, 1995;47(3-4):219-28.
15. Pijoan C, Morrison RB, Hilley HD. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. *Journal of Clinical Microbiology*, 1983;18(1):143-5.
16. Oliveira S, Pijoan C. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. *Journal of Swine Health and Production*, 2002;10(5):221-5.
17. Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1995;7(4):476-80.
18. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *American Journal of Veterinary Research*, 1992;53(5):659-64.

4. CAPÍTULO 2

Antimicrobial susceptibility profile of Brazilian *Haemophilus parasuis* isolates

Monique Salete Lorenson¹, Michela Miani¹, João Antônio Guizzo¹, Luiz Carlos Kreutz¹, Elias Fernando Rodríguez Ferri², César B. Gutiérrez Martín², Rafael Frandoloso^{1*}

(Artigo submetido ao periódico *Research in Veterinary Science* - 2014)

¹ Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Brasil

² Department of Animal Health, University of León, Spain

*Corresponding author: Rafael Frandoloso, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus I, Bairro São José. CEP 99052-100. Telefone: +55 54 3316 8485; Fax: +55 54 3316 8163. E-mail: rfran@upf.br

Abstract

Haemophilus parasuis (HPS) is a commensal bacterium of the upper respiratory tract of swine and it is the etiological agent of Glässer's disease. Thirty-five Brazilian HPS isolates were tested for their susceptibility profile to 10 antimicrobials by the broth microdilution method. All isolates were susceptible to ceftiofur, gentamycin and erythromycin. A low degree of resistance was observed for ampicillin (2.8%), and a moderate rate for penicillin (11.4%). All (lincomycin or kanamycin) or most (cephalotin) isolates were inhibited at the lowest minimal inhibitory concentration (MIC) tested. Bacitracin and sulfathiazole were effective at higher MICs, suggesting acquired resistance in some isolates. In conclusion, our results showed that Brazilian HPS isolates display low antimicrobial resistances to the 10 antimicrobials tested.

Keywords: *Haemophilus parasuis*, antimicrobial susceptibility, clinical isolates

Main text

Haemophilus parasuis (HPS) is a commensal bacterium of the upper respiratory tract of swine, of particular interest for porcine intensive industry. Fifteen HPS serotypes have been classified and some of them cause Glässer's disease (Costa-Hurtado and Aragon, 2013), a systemic infection characterized by fibrinous polyserositis, polyarthritis and meningitis (Oliveira et al., 2001). As a consequence of the high morbidity, pig husbandry endures important economical losses because of the high cost of antibiotics and the mortality rate of sick piglets. Because of the phenotypic heterogeneity of the 15 known HPS serotypes and the high number of uncharacterized clinical isolates (Oliveira et al., 2001), it is difficult to develop an efficient vaccine for Glässer's disease. However, recent studies have focused on this important matter (Frاندoloso et al., 2011). The current commercial vaccines give only partial protection, so antimicrobial agents are routinely used for the control and treatment of HPS-related porcine respiratory diseases (de la Fuente et al., 2007).

The choice of the right antimicrobial drug is crucial and depends on the knowledge of the susceptibility pattern of HPS to commercial antimicrobial agents (Aarestrup et al., 2004; Dayao et al., 2014; de la Fuente et al., 2007). Countries with important swine production such as China (Zhou et al., 2010), Spain, United Kingdom (de la Fuente et al., 2007), Denmark (Aarestrup et al., 2004) and Australia (Dayao et al., 2014) have tested HPS clinical isolates to characterize local antimicrobial resistance profiles. Despite Brazil being one of the most important countries in the pig industry, there are no data available on local HPS antimicrobial sensibility pattern.

Against this background we performed an *in vitro* susceptibility assay on 35 HPS clinical isolates recovered from Southern Brazil between August 2013 and June 2014 from pigs suffering Glässer's disease. All isolates were obtained from fibrinous pericarditis-diagnosed animals and the presence of HPS was confirmed by polymerase chain reaction detecting the gene 16S (Oliveira et al., 2001). Antimicrobial susceptibility was determined by broth microdilution method, using a pre-cast panel with 10 antimicrobial agents (Sigma-Aldrich). Briefly, antibiotic solutions were prepared according to Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines (CLSI, 2008) and used at the following concentrations: 0.25-256 µg/ml lincomycin (LCM), 0.5-64 µg/ml erythromycin (ERY), 0.5-256 µg/ml ceftiofur (XNL), 1-128 µg/ml gentamycin (GEN), 2-256 µg/ml cephalotin (CF), 0.12-128 µg/ml penicillin (PEN), 0.25-128 µg/ml ampicillin (AMP), 2-256 µg/ml kanamycin (KAN), 2-256 µg/ml bacitracin (BAC), 2-256 µg/ml

sulphathiazole (STZ). To prepare bacterial inoculum, isolates were grown in agar chocolate (37°C, 5% CO₂) for 24 h. Bacteria were then harvested and added to a supplemented pleuropneumonia-like organism (PPLO) broth (2.5 mg/ml glucose and 75 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) to reach a 0.15 optical density (600 nm, NanoPhotometer, Implen), equivalent to 0.5 MacFarland standard. 5 x 10⁵ CFU/ml were incubated for 24 h (37°C) under shaking (500rpm, Termo-Shaker, VHD). The evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) was done according to CLSI guidelines (CLSI, 2008). The MIC was defined as the lowest concentration at which no visible bacterial growth was detected. The breakpoints for PEN, AMP, XNL, and ERY were used as described previously (Aarestrup et al., 2004). Breakpoint value for GEN was used as recommended by CLSI (CLSI, 2008) for *A. pleuropneumoniae*. For the remaining antimicrobials, the distribution of strains over the MIC range was considered, as there are no CLSI approved specifications available for HPS susceptibility test or related fastidious microorganisms. *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090 and the HPS Nagasaki strain were used as control.

The results of the susceptibility assay are shown in Table 1. Concerning β-lactamic compounds tested, all isolates were susceptible to XNL with 75% of them being sensitive to the lowest MIC tested (0.25 µg/ml). Similar results were obtained in isolates from Denmark (Aarestrup et al., 2004), Spain (de la Fuente et al., 2007), Czech Republic (Nedbalcova and Kucerova, 2013) and Australia (Dayao et al., 2014), underlying a potential therapeutic role for this antibiotic in HPS infection. A low resistance profile was found against AMP (2.8%), and a moderate rate to PEN (11.4%). Resistance to PEN was much higher than that usually detected in HPS clinical isolates; however, a 60% resistance to PEN was found in Spanish isolates (de la Fuente et al., 2007). Eighty percent of isolates resulted in a susceptibility of 2 µg/ml to CF, a first-generation cephalosporin, but 8.6% of them needed a dose ≥ 16 µg/ml, indicating perhaps a resistance to this antimicrobial agent.

For aminoglycosides and macrolides, all isolates were 8 times more susceptible to GEN (1 µg/ml) and ERY (0.5 µg/ml) than their standard breakpoints. As no defined breakpoint has been established for the other antimicrobials, it was not possible to calculate their resistance or susceptibility profiles. However, using CLSI dilutions for lincosamides (CLSI, 2008) isolates were found to be susceptible to the lowest MIC tested (0.25 µg/ml), suggesting a high activity of this antimicrobial agent to the Brazilian HPS compared. All isolates were susceptible to the

lowest KAN MIC used (2 µg/ml). BAC and STZ showed a sensitive pattern, resulting in susceptibility for higher doses (MIC₅₀ of 32 and 16 respectively). A total of 11.4% of isolates were susceptible to BAC lowest concentration (2 µg/ml), and 14.3% to STZ. Interestingly, STZ MIC₅₀ and MIC₉₀ were 16 and 64 µg/ml, being respectively 8 and 4 times lower than those detected in Spanish HPS isolates, and 4 and 2 times lower than those reported for British HPS isolates (de la Fuente et al., 2007). Even so, the bimodal distribution showed by these two antimicrobial compounds seem to suggest the development of acquired resistance in some HPS isolates.

In conclusion, a susceptibility profile for HPS isolated from Southern Brazil is reported, indicating a high susceptibility to four of the most commonly used antimicrobials: AMP, XNL, GEN and ERY.

Table 1Antibiotic susceptibility profile of 35 field isolates of *Haemophilus parasuis*.

Antimicrobial Agent	Number of isolates with (MIC µg/mL) of												MIC ₅₀	MIC ₉₀	% resistance
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			
Penicillin (PEN)	21	1	6	1	2	2	1	1					0.12	4	11.4
Ampicillin (AMP)		26	1	2	1	4			1				0.25	4	2.8
Ceftiofur (XNL)			28	3	2	2							0.5	2	0
Gentamicin (GEN)				35									1	1	0
Erythromycin (ERY)			35										0.5	0.5	0
Lincomycin (LCM)		35											0.25	0.25	---
Cephalotin (CF)					28	4	2		1				2	8	---
Kanamycin (KAN)					35								2	2	---
Bacitracin (BAC)				4	1		10	14	5		1		32	64	---
Sulphathiazole (STZ)					5	3	10	14	2	1			16	64	---

MIC₅₀, MIC₉₀ – the lowest concentration of antimicrobial agent capable of inhibiting the growth of 50% and 90% of isolates, respectively. CLSI resistance breakpoints are indicated with vertical black lines when available.

Acknowledgements

This work was supported by the Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), grant 12/1516-4. Monique S. Lorenson is a Master Student with a UPF fellowship. Laboratory researchers M. Miani and J.A. Guizzo were supported respectively by the National Postdoctoral Program (PNPD-CAPES) and by the Undergraduate fellowships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Angen, O., 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary Microbiology* 101, 143-146.
- CLSI, C.L.S.I., 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, Third edition. CLSI Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Costa-Hurtado, M., Aragon, V., 2013. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Journal* 198, 571-576.
- Dayao, D.A., Kienzle, M., Gibson, J.S., Blackall, P.J., Turni, C., 2014. Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology*.
- de la Fuente, A.J., Tucker, A.W., Navas, J., Blanco, M., Morris, S.J., Gutierrez-Martin, C.B., 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* 120, 184-191.
- Frndoloso, R., Martinez, S., Rodriguez-Ferri, E.F., Garcia-Iglesias, M.J., Perez-Martinez, C., Martinez-Fernandez, B., Gutierrez-Martin, C.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. *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 50-58.
- Nedbalcova, K., Kucerova, Z., 2013. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. *Acta Veterinaria Brno* 82, 3-7.
- Oliveira, S., Galina, L., Pijoan, C., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13, 495-501.
- Zhou, X., Xu, X., Zhao, Y., Chen, P., Zhang, X., Chen, H., Cai, X., 2010. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 141, 168-173.

5. CAPÍTULO 3

Padronização da técnica de hemaglutinação indireta modificada (HI_m) para a sorotipificação de isolados de campo de *Haemophilus parasuis*

Monique Salete Lorenson¹, Michela Miani¹, João Antônio Guizzo¹, Luiz Carlos Kreutz¹, Elias Fernando Rodríguez Ferri², César B. Gutiérrez Martín², Rafael Frandoloso^{1*}

(Artigo que será submetido ao periódico *Research in Veterinary Science*)

¹ Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Brasil

² Department of Animal Health, University of León, Spain

*Corresponding author: Rafael Frandoloso, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus I, Bairro São José. CEP 99052-100. Telefone: +55 54 3316 8485; Fax: +55 54 3316 8163. E-mail: rfran@upf.br

Resumo

O *Haemophilus parasuis* (HPS) é uma bactéria Gram negativa, pleomórfica, fastidiosa e fenotipicamente heterogênea. Atualmente, este microrganismo pode ser classificado em 15 sorotipos, no entanto, em razão dos diferentes graus de virulência, somente alguns sorotipos podem desencadear a Doença de Glässer. Neste trabalho, com o objetivo de conhecer o perfil fenotípico de isolados clínicos de HPS oriundos de granjas de suínos da região sul do Brasil, desenvolvemos um painel de antissoros policlonais contra os sorotipos de referência de *H. parasuis* e propomos uma modificação na técnica de hemaglutinação indireta (HI) clássica. Nossos resultados demonstram que ratas Wistar constituem um modelo animal adequado para produção de antissoros específicos contra HPS e que a técnica de HI modificada (HIm), apresenta sensibilidade e alta especificidade para a sorotipificação de HPS. Por último, dos 8 isolados clínicos de *H. parasuis* sorotipificados mediante HIm, 37.5% (3) foram classificados como sendo do sorotipo 4, 37.5% (3) do sorotipo 12, 12.5% (1) do sorotipo 15 e 12.5% (1) não tipificável.

Palavras-chave: *H. parasuis*, hemaglutinação indireta modificada, sorotipificação

Introdução

O *Haemophilus parasuis* (HPS) é um bacilo Gram-negativo membro da família *Pasteurellaceae*, normalmente encontrado no trato respiratório superior de suínos. Fenotipicamente, o HPS pode ser classificado em 15 sorotipos, com diferentes graus de virulência (1). Os sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 são classificados como altamente virulentos; sorotipos 2, 4 e 15 como moderadamente virulentos; e os sorotipos 3, 6, 7, 8, 9 e 11 como não ou pouco virulentos (2). Tradicionalmente, sorotipos virulentos estão associados com o desenvolvimento da Doença de Glässer, no entanto, parecem existir cepas de um mesmo sorotipo com diferentes graus de virulência.

Atualmente, a sorotipificação de HPS é realizada mediante dois métodos aceitos pela comunidade científica. O primeiro baseia-se na imunodifusão em gel de antígenos termo-resistentes autoclavados, conhecido internacionalmente como esquema Kielstein-Rapp-Gabrielson (KRG) (4). O segundo método é mais específico e se baseia na hemaglutinação indireta (HI) (3-5). Apesar de HPS possuir uma classificação fenotípica definida, um número considerável de isolados clínicos não podem ser sorotipificados mediante os métodos sorológicos tradicionais (6, 7), indicando a existência de mais do que 15 sorotipos (8) e sugerindo, uma revisão da atual classificação fenotípica deste microrganismo.

Com relação a sua distribuição, não existe um perfil único de prevalência de sorotipos virulentos ou de virulência moderada nos países com suinocultura tecnificada, diminuindo consideravelmente o sucesso das vacinas comerciais utilizadas nos programas de prevenção da Doença de Glässer.

Conhecer a distribuição fenotípica de HPS em regiões produtoras de suínos é essencial para o desenvolvimento de ferramentas imuno-preventivas modernas, que contemplem as necessidades singulares de cada região ou país. Neste trabalho, com o objetivo de desenvolver reagentes biológicos necessários para o desenvolvimento de estudos fenotípicos com HPS, produzimos um painel de antissoros específicos contra os sorotipos de referências de *H. parasuis* e propomos uma modificação na técnica de hemaglutinação indireta (HI_m) utilizada para a sorotipificação deste microrganismo.

Materiais e métodos

Cepas de referência de *H. parasuis*

As cepas de referência de *H. parasuis* utilizadas neste estudo, representando os sorotipos 1 ao 15 (H409, H410, H411, H412, H413, H780, Nagasaki, H494, H553, H555, H465, H425, H793, H792 e H790), foram gentilmente doadas pelo Dr. Elías F. Rodríguez-Ferri, da Universidade de León, Espanha. Os microrganismos foram cultivados em placas de ágar chocolate suplementadas com 2.5 mg/ml de glicose (Sigma) e 72 µg/ml de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Sigma) a 37°C durante 24 - 36 horas, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

Produção dos antissoros policlonais

Os antissoros policlonais contra os 15 sorotipos de referência de *H. parasuis* foram produzidos em ratas da raça Wistar. Os inóculos bacterianos, constituídos por corpos celulares inteiros, foram devidamente inativados com timerosal (9) e ajustados numa concentração de 5×10^8 UFC/ml. Em seguida, foram misturados com adjuvante oleoso (adjuvante completo e incompleto de Freund – Sigma), na proporção de 1:1.2 a favor do adjuvante. O protocolo de hiperimunização foi realizado conforme descrito por Rudbach et al. (11). A cinética da resposta de anticorpos induzidos pelos diferentes antígenos foi avaliada mediante um ELISA indireto (10). Após conclusão do processo de imunização, os animais foram devidamente anestesiados (Isoflurano) e procedeu-se a extração total sanguínea (11). Este experimento foi aprovado pelo *Comitê de Ética para o Uso de Animais em Pesquisa*, processo nº 039/2012. Durante o experimento, os animais permaneceram no biotério da Universidade de Passo Fundo, alojados em gaiolas individuais, recebendo alimentação sólida e água *ad libitum*, respeitando as condições sanitárias e de bem estar animal.

Adsorção dos antissoros frente aos sorotipos de referência heterólogos

Com o objetivo de remover os anticorpos que reagem de maneira cruzada contra os sorotipos heterólogos de *H. parasuis*, foram realizadas adsorções de cada antissoro frente aos 14 sorotipos heterólogos. Para isso, os sorotipos de referência de *H. parasuis* foram crescidos em ágar chocolate, inativados com timerosal a 0,05%, lavados e ressuspensos em solução salina fosfatada (PBS, pH 7.2). Cada antissoro foi adicionado a um “mix” contendo os 14 sorotipos de

referência heterólogos. A reação foi incubada a 37°C durante 2 horas e overnight a 4°C. No dia seguinte, após centrifugação (8.000 rpm por 10 min), coletou-se o sobrenadante e este procedimento foi repetido uma vez mais. Em seguida, todos os antissoros foram rapidamente absorvidos frente a uma suspensão de hemácias de cordeiro a 10%, incubando-se durante uma hora à temperatura ambiente. Após centrifugação, (1500 rpm por 10 min) o sobrenadante foi coletado e procedeu-se a inativação do sistema do complemento.

Extração de antígenos superficiais de *H. parasuis*

Os antígenos termo-resistentes de *H. parasuis* foram obtidos a partir de um cultivo de 18 horas, cultivado em ágar chocolate. A massa bacteriana coletada foi ressuspensa em 1 ml de solução salina a 0,9% (SA) e submetida a um tratamento térmico a 94°C durante 1 hora. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante, colhido e utilizado imediatamente para sensibilizar as hemácias.

Obtenção e tanização das hemácias de carneiro

Com o objetivo de preparar quimicamente a superfície das hemácias para receber os antígenos de *H. parasuis*, realizou-se um tratamento com ácido tânico. As hemácias foram coletadas de carneiros da raça *Ile de France* mediante punção na veia jugular, utilizando-se tubos do tipo Vacutainer[®] contendo EDTA (BD). Após centrifugação do sangue total (1.500 rpm por 3 min), a fração líquida e o anel de leucócitos depositado sobre a fração eritrocitária foram eliminados e as hemácias lavadas 3 vezes com solução salina (SA) a 0,9%. Em seguida, em uma solução de ácido tânico (Sigma-Aldrich) diluída 1:20.000 em SA, adicionou-se 3% de hemácias frescas. Após incubação a 37°C durante 10 min, procedeu-se, gentilmente, 3 lavados com SA, com o objetivo de eliminar totalmente resíduos de ácido tânico.

Sensibilização das hemácias

Para proceder-se a adsorção dos antígenos de *H. parasuis* na superfície das hemácias, primeiramente, ajustou-se a concentração do antígeno (puro), diluindo o mesmo 1:5 em SA. Posteriormente, para cada 1 ml de antígeno diluído, adicionou-se 3% de hemácias tanizadas e incubou-se a 37°C, em agitação leve (300 rpm), durante 90 minutos. Após, as hemácias foram centrifugadas (1500 rpm por 3 minutos) e lavadas 3 vezes com tampão de diluição (SA contendo

1% de BSA). Por último, as hemácias sensibilizadas foram ajustadas numa concentração final de 0,75% em tampão de diluição e imediatamente utilizadas na sorotipificação.

Desenvolvimento da técnica de HIm

Sobre microplacas de fundo “U” de 96 cavidades, procedeu-se a diluição seriada dos 15 antissoros policlonais de referência, utilizando-se volumes de 50 µl, começando com o soro diluído 1:10. A seguir, o mesmo volume de uma suspensão de hemácias sensibilizadas com o antígeno de interesse foi adicionado em todas as cavidades da placa contendo os antissoros. As microplacas foram gentilmente homogeneizadas e incubadas a 37°C durante 2 horas. Como controle negativo, utilizou-se: hemácias não sensibilizadas + tampão de diluição, hemácias sensibilizadas + tampão de diluição, hemácias não sensibilizadas + antissoro de referência. Como controle positivo, utilizaram-se hemácias sensibilizadas + antissoro homólogo de referência.

O título de cada antissoro foi expresso como a recíproca da maior diluição do soro onde ocorreu uma reação positiva. Quando um isolado apresentou reação positiva frente a mais de um antissoro, considerou-se o sorotipo com maior título de aglutinação, sempre que houvesse, no mínimo, duas diluições de diferença entre os títulos dos antissoros testados. Quando não se pode observar estas diferenças, considerou-se como um isolado não tipificável.

Resultados e discussão

Produção de antissoros policlonais em ratas Wistar

A resposta imune humoral específica, desenvolvida nos animais durante o processo de imunização, foi analisada mediante um teste do tipo ELISA (10, 12). Conforme representado na Figura 1, todos os animais imunizados com os diferentes sorotipos de referência soroconverteram após a segunda imunização. Os títulos de anticorpos mais elevados foram detectados nos animais que receberam os sorotipos 4 e 14, com valores de 1.335 ± 0.3 e 1.229 ± 0.2 , respectivamente, 14 dias após a segunda imunização. Por outro lado, os sorotipos 11 e 12 foram os que menos induziram a produção de anticorpos no mesmo período, com valores de 0.799 ± 0.2 e 0.862 ± 0.2 , respectivamente. Detectou-se que a maioria dos animais apresentaram soroconversão após a primeira imunização, com exceção dos animais imunizados com os sorotipos 12 e 14 (Figura 1 – B), que apresentaram um incremento notável de anticorpos, porém, insuficiente para ser considerado como uma soroconversão. O animal imunizado com o sorotipo 5, apresentou

aumento de anticorpos bastante expressivo após a primeira imunização, no entanto, se manteve praticamente sem alteração após a segunda imunização.

A produção de antissoros para a sorotipificação de *H. parasuis*, até o momento, sempre foi realizada em coelhos da raça Nova Zelândia (3, 13, 14). Nesta dissertação, realizou-se a imunização de coelhos com os 15 sorotipos de referência de *H. parasuis*, no entanto, todos os coelhos utilizados apresentavam, antes da primeira imunização, elevados títulos de anticorpos com reatividade cruzada contra todos os sorotipos de referência de *H. parasuis* (testado por ELISA e por Dot Blot), impossibilitando a utilização desse modelo animal para o desenvolvimento dos antissoros em nosso estudo (dados não mostrados). Hipoteticamente, sugerimos que esses anticorpos com reatividade cruzada possam ter sido desenvolvidos contra microrganismos presentes no ambiente de origem desses animais, sugerindo-se que coelhos da raça Nova Zelândia produzidos de forma convencional são inapropriados para o desenvolvimento de antissoros contra *H. parasuis*.

Apesar do volume sanguíneo das ratas ser consideravelmente inferior ao obtido em coelhos, esta espécie animal demonstrou-se ser uma excelente alternativa para produção de antissoros contra *H. parasuis*, tendo, como vantagens, o fácil manejo dos animais, os altos títulos de anticorpos desenvolvidos e a ausência de anticorpos que reagem cruzadamente com *H. parasuis* antes da imunização.

Hemaglutinação indireta modificada (HIIm)

O teste de HIIm proposto em nosso estudo, baseou-se na capacidade das hemácias, previamente tratadas com ácido tânico, de adsorverem em sua superfície os antígenos estruturais extraídos de *Haemophilus parasuis*, etapa fundamental para o sucesso da técnica de HI. O contato das hemácias com o ácido tânico provoca alterações em sua superfície, aumentando a capacidade de adsorver proteínas, lipoproteínas e carboidratos (15). Consequentemente, quando anticorpos específicos entram em contato com as hemácias sensibilizadas com os respectivos antígenos, ocorre a hemaglutinação. O teste de Hemaglutinação Indireta clássica, para sorotipificação de *H. parasuis* (3), baseia-se na capacidade natural dos carboidratos das hemácias de cordeiros de adsorver antígenos superficiais de *H. parasuis*, não sendo necessários tratamentos químicos. No entanto, em nosso laboratório, utilizando hemácias de carneiros da raça *Ile de France*, não foi possível reproduzir os protocolos de sorotipificação previamente publicados (3-

5). Depois de inúmeras tentativas falhas, inclusive com antissoros provenientes de outros grupos de pesquisa (3), utilizados como controles positivos, decidimos investigar a causa do insucesso deste teste. Após comprovar que todos os antissoros de referência provenientes de outros grupos de pesquisa, e todos os antissoros produzidos em nosso estudo, reconheciam antígenos nativos de *H. parasuis*, mediante Dot Blot, foram coletadas hemácias de diferentes carneiros e cordeiros de várias idades, e, todas as células testadas não foram capazes de fixar antígenos de *H. parasuis* em sua superfície.

Em base a este histórico, iniciamos um protocolo de padronização da técnica HIM, baseada em estudos realizados com outros microrganismos (15, 16). Este novo teste, possui basicamente três diferenças com relação ao HI clássica: 1º) que as hemácias são tratadas quimicamente para maior exposição de carboidratos superficiais, adquirindo maior capacidade de adsorção de antígenos; 2º) que as hemácias, após sensibilização, são bloqueadas com um solução contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA), evitando uniões inespecíficas de proteínas associadas ao soro; 3º) os antissoros são diluídos seriadamente na mesma solução de bloqueio, evitando a hemaglutinação espontânea das hemácias.

Pavia et al. (15), descrevem a utilização de soro normal de coelho, numa concentração 1% em SA, para bloquear as hemácias tanizadas, como também, para diluir os antissoros policlonais. Nossos resultados demonstram a impossibilidade de utilizar-se soro normal de coelho convencional, devido à existência de imunoglobulinas nesses animais, que reconhecem, de maneira cruzada, antígenos de *H. parasuis*, ocasionando hemaglutinação espontânea e invalidando o teste. Como medida corretiva, o soro normal de coelho foi substituído por BSA e, como resultado, as reações falso positivas desapareceram, facilitando a interpretação do teste.

Com relação à titulação dos antissoros, demonstramos neste trabalho, que o modelo murino apresenta importantes qualidades imunológicas para a produção de imunoglobulinas altamente específicas e funcionais para a técnica de HIM. Conforme representado na tabela 1, os sorotipos que induziram títulos mais expressivos de imunoglobulinas foram os sorotipos 2 (10.240), 3 (5.120) e 8 (5.120). Os demais antissoros apresentaram títulos inferiores (entre 1.280 e 2.560), no entanto, suficientemente altos para serem utilizados com segurança na HIM, já que as reações cruzadas, entre sorotipos heterólogos, geralmente ocorrem em títulos mais baixos (4). Reações cruzadas entre os sorotipos de referência após a adsorção dos antissoros foram mínimas, e destaca-se, unicamente, uma reação cruzada entre os sorotipos 2 e 11, em ambos sentidos.

Uso da HIm para sorotipificação de isolados clínicos de *H. parasuis*

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade e especificidade do teste de HIm, realizamos a sorotipificação de 8 isolados clínicos de *H. parasuis*, obtidos durante o desenvolvimento dos estudos descritos nos capítulos 1 e 2.

Nossos resultados demonstram, como representado na figura 2, que a técnica de HIm apresenta sensibilidade e alta especificidade para a sorotipificação de *H. parasuis*. Dos isolados clínicos avaliados (22% do total das amostras), 37.5% (3) reagiram fortemente com o antissoro 12, 37.5% (3) reagiram com o antissoro 4 e 12.5% (1) como antissoro 15. Doze e meio por cento dos isolados não puderam ser tipificados mediante o teste de HIm, por reagirem de maneira semelhante frente a dois ou mais antissoros (Fig. 3).

Estudos prévios realizados no Brasil, demonstram uma alta prevalência do sorotipo 4, seguido pelos sorotipos 5, 14, 13 e 2, em granjas da região centro-oeste e sudeste (6, 17), advertindo uma similaridade com relação aos nossos resultados. Por outro lado, mesmo sendo um estudo piloto, o sorotipo 12 demonstrou-se altamente prevalente em nosso estudo, este resultado, chama a atenção para a circulação na região sul de um sorotipo altamente virulento, praticamente indetectável em outros estados brasileiros com destacada produção de suínos (6, 17, 18).

A detecção do sorotipo 15, igualmente em outros países (18), foi baixa (12,5%), no entanto, demonstra a variabilidade fenotípica existente na nossa região. A presença de isolados não tipificáveis (12.5%), assim como em outros estudos de sorotipificação (4, 6, 13, 17), confirma a existência de cepas com características antigênicas distintas e que podem, em conjunto com os outros sorotipos detectados neste estudo, explicar o insucesso das atuais bacterinas comerciais utilizadas no Brasil, formuladas quase que exclusivamente com o sorotipo 5 de *H. parasuis*.

Por último, mediante a técnica de HIm proposta neste trabalho, estudos mais robustos de sorotipificação de isolados clínicos de HPS da região sul deverão ser realizados, para assim, caracterizar o perfil sorotípico deste microrganismo e proporcionar informações concretas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes, visando à redução das perdas econômicas e aumentando a qualidade de vida dos animais.

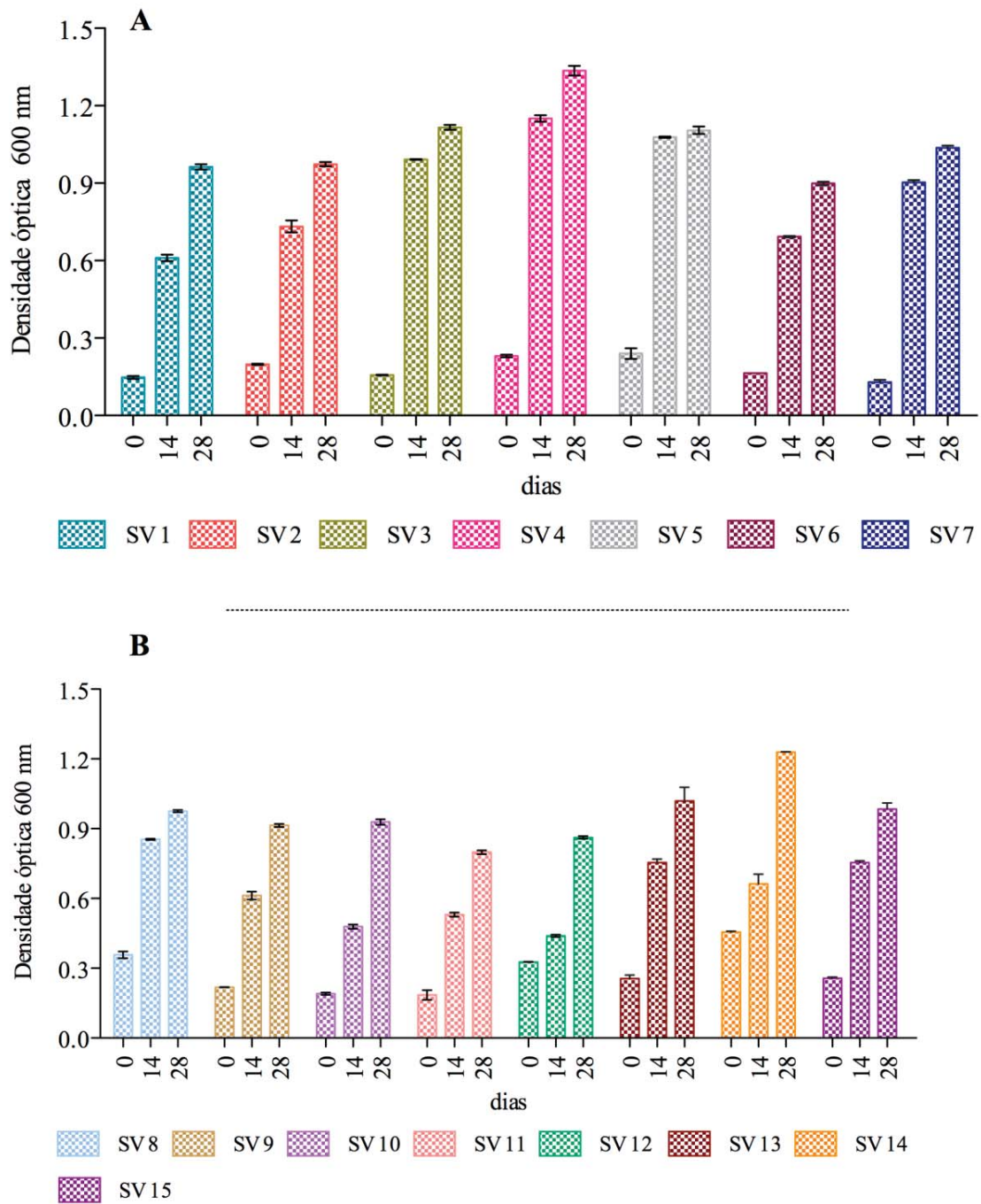


Figura 1. Desenvolvimento de antissoros específicos contra os sorotipos de referência de *H. parasuis* em ratos Wistar. A e B representam a cinética de anticorpos induzidos durante o protocolo de imunização. Os anticorpos foram avaliados mediante um ELISA indireto em três pontos do protocolo: antes da primeira imunização (dia 0), 14 dias após aplicação da primeira dose (dia 14) e 14 dias após a segunda dose (dia 28).

Tabela 1

Resultados do teste de HIm com antissoros produzidos em ratas Wistar frente aos sorotipos de referência homólogos.

Sorotipo (cepa de referência)	Antissoros														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 (H 409)	1280														
2 (H 410)		10240													
3 (H 411)			5120												
4 (H 412)				1280											
5 (Nagasaki)					1.280										
6 (H 780)						2560									
7 (H 643)							1280								
8 (H 494)								5120							
9 (H 553)									2560						
10 (H 555)										1280					
11 (H 465)											2560				
12 (H 425)												1280			
13 (H 793)													2560		
14 (H 792)														2560	
15 (H790)															1280

Os títulos são expressos como os recíprocos das diluições finais de soro com reação positiva.

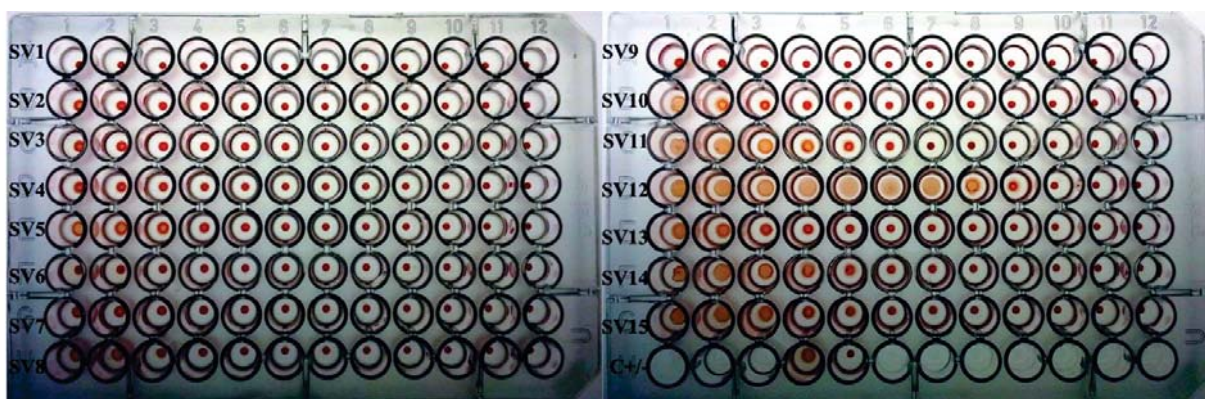


Figura 2. Sorotipificação de *H. parasuis* através da HIm. Nas microplacas estão dispostos os 15 antissoros de referência (SV1 ao SV15) produzidos em ratos Wistar. Pode-se apreciar, de forma clara, que os antígenos do isolado clínico em teste reagem fortemente (título de 1:1.280) contra o antissoro 12 (SV12), sendo este o sorotipo atribuído ao isolado. Reações cruzadas são advertidas contra os sorotipos 5 (1:10), 10 (1:10), 11 (1:40), 13 (1:10), 14 e 15 (1:40), no entanto, os títulos são expressivamente inferiores.

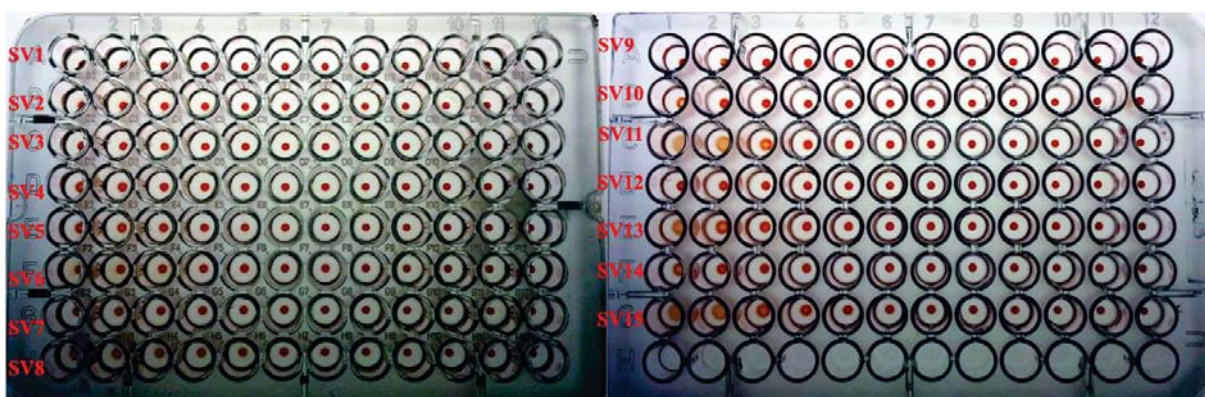


Figura 3. Isolado clínico não sorotificável através da HIm. Observa-se que os antissoros SV11 e SV15 reagem com a mesma intensidade contra os antígenos extraídos do isolado clínico (título de 1:40), não sendo possível assignar um sorotipo específico ao isolado.

Referências

1. Rapp-Gabrielson VJ, Oliveira SR, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Disease of Swine. Ames, Iowa: Blacwell Publishing; 2006. p. 681-90.
2. Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary Microbiology*. 2004;99(1):1-12.
3. Del Rio ML, Gutierrez CB, Rodriguez Ferri EF. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003;41(2):880-2.
4. Turni C, Blackall PJ. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology*, 2005;106(1-2):145-51.
5. Tadjine M, Mittal KR, Bourdon S, Gottschalk M. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004;42(2):839-40.
6. Castilla KS, de Gobbi DD, Moreno LZ, Paixao R, Coutinho TA, dos Santos JL, et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. *Research in Veterinary Science*. 2012;92(3):366-71.
7. Turni C, Blackall PJ. Serovar profiling of *Haemophilus parasuis* on Australian farms by sampling live pigs. *Australian Veterinary Journal*, 2010;88(7):255-9.
8. Rafiee M, Blackall PJ. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Australian Veterinary Journal*, 2000;78(3):172-4.
9. de la Fuente AJ, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Barbosa JI, Martinez-Martinez S, Frandoloso R, Tejerina F, et al. Blood cellular immune response in pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Research in Veterinary Science*, 2009;86(2):230-4.
10. Martin de la Fuente AJ, Rodriguez-Ferri EF, Frandoloso R, Martinez S, Tejerina F, Gutierrez-Martin CB. Systemic antibody response in colostrum-deprived pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Research in Veterinary Science*, 2009;86(2):248-53.
11. Rudbach JA, Cantrell JL, Ulrich JT. Methods of Immunization to Enhance the Immune Response to Specific Antigens InVivo in Preparation for Fusions Yielding Monoclonal Antibodies. In: Davis WC, editor. *Monoclonal Antibody Protocols. Methods in Molecular Biology™*. 45. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1995.

12. Solano-Aguilar GI, Pijoan C, Rapp-Gabrielson V, Collins J, Carvalho LF, Winkelman N. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. *American Journal Veterinary Research*, 1999;60(1):81-7.
13. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992;30(4):862-5.
14. Morozumi T, Nicolet J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986; 23(6):1022-5.
15. Pavia CS, Wormser GP, Bittker S, Cooper D. An indirect hemagglutination antibody test to detect antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease. *Journal of Microbiological Methods*, 2000;40(2):163-73.
16. Boyden SV. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *The Journal of Experimental Medicine*, 1951;93(2):107-20.
17. Macedo NR, Oliveira SR, Lage AP, Santos JL, Araujo MR, Guedes RM. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. *Veterinary Journal*, 2011;188(3):362-4.
18. Luppi A, Bonilauri P, Dottori M, Iodice G, Gherpelli Y, Merialdi G, et al. *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013;60(2):140-2.

6. CONCLUSÕES

Infecções produzidas por *Haemophilus parasuis* representam, atualmente, um dos principais gargalos preventivos para suinocultura mundial. Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- a) Pulmões com lesões de pleurite e pneumonia procedentes de animais de terminação não são indicados para o isolamento de *H. parasuis*.
- b) *H. parasuis* confirmou-se altamente prevalente em doenças clínicas sistêmicas nas fases iniciais de produção de suínos, especialmente na creche, destacando assim, a presença desse microrganismo nas granjas da região sul do Brasil.
- c) Isolados de *H. parasuis* da região sul do Brasil apresentam elevada suscetibilidade aos antimicrobianos ampicilina, ceftiofur, gentamicina e eritromicina, comumente utilizados na clínica terapêutica de suínos.
- d) Os antissoros de referência de *H. parasuis* produzidos em ratas Wistar demonstraram alta especificidade e títulos de anticorpos, convertendo este modelo animal em uma boa alternativa para a produção de antissoros policlonais deste microrganismo.
- e) A técnica de hemaglutinação indireta modificada permite sorotipificar com elevada sensibilidade e especificidade isolados clínicos de *H. parasuis*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a Doença de Glässer, causada pelo *Haemophilus parasuis*, vem se destacando como uma das principais doenças emergentes dos rebanhos suínos, responsável por produzir significativas perdas econômicas para suinocultura mundial.

Surtos da Doença de Glässer são cada vez mais frequentes nos países que possuem sistemas de produção intensivo de suínos, como também, o uso de bacterinas comerciais para a prevenção desta doença. Por tratar-se de um microrganismo extremamente heterógeno desde o ponto de vista antigênico e de virulência, o sucesso das vacinas comerciais é limitado e restrito ao sorotipo contido na sua formulação vacinal, repercutindo, de forma negativa, para a prevenção das infecções produzidas por *H. parasuis*.

Neste trabalho, destacamos a presença e circulação de cepas virulentas de *H. parasuis* nos rebanhos de suínos da região sul do Brasil, também, descrevemos que estas cepas apresentam um elevado perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, existindo um grupo de princípios ativos que podem ser utilizados tanto nos protocolos de antibiótico terapia preventiva, como, também, diante de surtos clínicos da Doença de Glässer.

A padronização da técnica de Hemaglutinação Indireta modificada proposta neste estudo permitirá o desenvolvimento de importantes estudos relacionados com a caracterização do perfil fenotípico de isolados de campo de *Haemophilus parasuis* presente em nosso estado e em outros que possuem destacada produção de suínos. Esta informação é especialmente importante para estimular o desenvolvimento de vacinas efetivas contra os sorotipos de maior prevalência no Brasil, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas da suinocultura industrial e aumentando a qualidade de vida dos animais. Por último, este estudo constitui o início do desenvolvimento de uma coleção de isolados de campo de *H. parasuis* do Laboratório de Imunologia e Microbiologia Avançada, que servirá como aporte de material biológico para futuros estudos relacionados com a genômica e proteômica deste microrganismo.

8. REFERÊNCIAS

1. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *Journal of Medical Microbiology*, 1969; 2(1):75-8.
2. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; 30(4):862-5.
3. Olvera van der Stoep A. Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis*: Universidade Aut3noma de Barcelona; 2006.
4. Castilla KS. Caracteriza33o gen3t3pica de cepas de *Haemophilus parasuis* [Tese]. S3o Paulo: Universidade de S3o Paulo, Faculdade de Medicina Veterin3ria e Zootecnia; 2008.
5. Kielstein P, Wuthe H, Angen O, Mutters R, Ahrens P. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. *Veterinary Microbiology*, 2001; 81(3):243-55.
6. Bakos K, A. Nilsson, Thal E. Untersuchungen 3ber *Haemophilus suis*. *Nordisk Veterinaermedizin*, 2003; 4:241-55.
7. Morozumi T, Nicolet J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986; 23(6):1022-5.
8. Kielstein P, Rosner H, Muller W. Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot-blot procedure. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 1991; 38(4):315-20.
9. Del Rio ML, Gutierrez CB, Rodriguez Ferri EF. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41(2):880-2.
10. Turni C, Blackall PJ. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology*, 2005; 106(1-2):145-51.
11. Cai X, Chen H, Blackall PJ, Yin Z, Wang L, Liu Z, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Veterinary Microbiology*, 2005; 111(3-4):231-6.
12. Angen O, Svensmark B, Mittal KR. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology*, 2004;103(3-4):255-8.
13. Tadjine M, Mittal KR, Bourdon S, Gottschalk M. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42(2):839-40.

14. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am J Vet Res.* 1992;53(5):659-64.
15. Blackall PJ, Trott DJ, Rapp-Gabrielson V, Hampson DJ. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 1997; 56(1-2):125-34.
16. Rafiee M, Bara M, Stephens CP, Blackall PJ. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Australian Veterinarian Journal*, 2000; 78(12):846-9.
17. Blackall PJ, Turni C. Understanding the virulence of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Journal*, 2013; 198(3):549-50.
18. Mullins MA, Register KB, Bayles DO, Butler JE. *Haemophilus parasuis* exhibits IgA protease activity but lacks homologs of the IgA protease genes of *Haemophilus influenzae*. *Veterinary Microbiology*, 2011;153(3-4):407-12.
19. Olvera A, Ballester M, Nofrarias M, Sibila M, Aragon V. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. *Veterinary Research*, 2009; 40(3):24.
20. Vanier G, Szczotka A, Friedl P, Lacouture S, Jacques M, Gottschalk M. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells. *Microbiology*, 2006;152(Pt 1):135-42.
21. Aragon V, Bouchet B, Gottschalk M. Invasion of endothelial cells by systemic and nasal strains of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Journal*. 2010;186(2):264-7.
22. Costa-Hurtado M, Aragon V. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Journal*, 2013;198(3):571-6.
23. Frandoloso R, Pivato M, Martinez-Martinez S, Rodriguez-Ferri EF, Kreutz LC, Martin CB. Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of AOC-45 porcine aorta endothelial cells. *BMC Veterinary Research*, 2013; 9:207.
24. Cerda-Cuellar M, Aragon V. Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine. *Veterinary Journal*. 2008; 175(3):384-9.
25. Zhang B, Tang C, Liao M, Yue H. Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors. *Veterinary Microbiology*, 2014; 168(1):1-7.
26. Blackall PJ, Pahoff JL. Characterisation of porcine haemophili isolated from Australian pigs between 1988 and 1992. *Australian Veterinary Journal*, 1995; 72(1):18-21.
27. Rubies X, Kielstein P, Costa L, Riera P, Artigas C, Espuna E. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Veterinary Microbiology*, 1999; 66(3):245-8.

28. Luppi A, Bonilauri P, Dottori M, Iodice G, Gherpelli Y, Merialdi G, et al. *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013; 60(2):140-2.
29. Rodrigues NR, Lage OAP, Guedes RMC. Epidemiologia molecular de *Haemophilus parasuis*. *Ciência Rural*, 2009; 39(8):2576-82.
30. Macedo NR, Oliveira SR, Lage AP, Santos JL, Araujo MR, Guedes RM. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. *Veterinary Journal*, 2011; 188(3):362-4.
31. Castilla KS, de Gobbi DD, Moreno LZ, Paixao R, Coutinho TA, dos Santos JL, et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. *Research in Veterinary Science*, 2012; 92(3):366-71.
32. Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary Microbiology*, 2004; 99(1):1-12.
33. Nedbalcova K, Satran P, Jaglic Z, Ondriasova R, Kucerova Z. *Haemophilus parasuis* and Glasser's disease in pigs: a review. *Veterinary Medicine*, 2006; 51(5):168-79.
34. Xu C, Zhang J, Zhao Z, Guo L, Zhang B, Feng S, et al. Antimicrobial susceptibility and PFGE genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from pigs in South China (2008-2010). *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2011; 73(8):1061-5.
35. Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1995;7(4):476-80.
36. Rapp Gabrielson VJ, Kocur GJ, Clark JT, Muir SK. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination. *Veterinary Medicine*. 1997.
37. Barcellos D, Sobestiansky J, Vieira HP, Vieira RP. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial. 2007.
38. de la Fuente AJ, Tucker AW, Navas J, Blanco M, Morris SJ, Gutierrez-Martin CB. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology*, 2007;120(1-2):184-91.
39. Frandoloso R, Martinez S, Rodriguez-Ferri EF, Garcia-Iglesias MJ, Perez-Martinez C, Martinez-Fernandez 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011;18(1):50-8.

40. Martinez S, Frandoloso R, Rodriguez-Ferri EF, Gonzalez-Zorn B, Gutierrez-Martin CB. Characterization of a recombinant transferrin-binding protein A (TbpA) fragment from *Haemophilus parasuis* serovar 5. FEMS Microbiology Letters, 2010; 307(2):142-50.
41. Smart NL, Miniats OP, Macinnes JI. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. Canadian Journal Veterinary Research, 1988;52(3):319-24.