

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

**DETERMINAÇÃO DOS SOROVARES DE *HAEMOPHILUS PARASUIS*
RELACIONADOS COM A DOENÇA DE GLÄSSER NO BRASIL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Julia Pires Espíndola

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

**DETERMINAÇÃO DOS SOROVARIES DE *HAEMOPHILUS PARASUIS*
RELACIONADOS COM A DOENÇA DE GLÄSSER NO BRASIL**

Julia Pires Espíndola

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

Orientador: Prof. Rafael Frandoloso

Passo Fundo, RS , Brasil

2017

**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

**DETERMINAÇÃO DOS SOROVARES DE *HAEMOPHILUS PARASUIS*
RELACIONADOS COM A DOENÇA DE GLÄSSER NO BRASIL**

Elaborada por
Julia Pires Espíndola

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

Comissão Examinadora

**Rafael Frandoloso, Ph.D Universidade de Passo Fundo
(Orientador/Presidente)**

Letícia Trevisan Gressler, Ph.D Universidade de Passo Fundo

Gustavo Machado, Ph.D University of Minnesota

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

CIP – Catalogação na Publicação

E77d Espíndola, Julia Pires

Determinação dos sorovares de Haemophilus
parasuis relacionados com a doença de Glässer no
Brasil / Julia Pires Espíndola. – 2017.

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Frandoloso.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2017

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues
Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Lueci e Juarez, pelo apoio e ensinamentos. Por sempre terem confiado em mim e me ajudado a realizar meus sonhos.

A minha família e amigos que me apoiaram em todas as horas, pela compreensão e carinho de todos.

Ao meu orientador, professor Rafael Frandoloso, por sua confiança, orientação, paciência e disponibilidade que foram fundamentais durante esse período. Obrigada por ter dividido o seu conhecimento comigo, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de mostrar minha capacidade.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada e do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação por todo o suporte durante o mestrado, pelo auxílio, discussões, aprendizado, amizade e companheirismo.

Agradeço à concessão da bolsa de gratuidade concedida pela Universidade de Passo Fundo, e ao CNPq por ter disponibilizados os recursos financeiros utilizados neste projeto. Ambos foram essenciais para realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i>	17
2.1.1 Aspectos históricos de <i>H. parasuis</i> e da Doença de Glässer	17
2.1.2 Morfologia	17
2.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>H. parasuis</i> e características bioquímicas	18
2.1.4 Isolamento	19
2.1.5 Tipificação de <i>H. parasuis</i>	19
2.2 <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i> E A DOENÇA DE GLÄSSER.....	22
2.2.1 Epidemiologia.....	22
2.2.2 Patogênese	24
2.2.3 Quadro clínico	25
2.2.4 Diagnóstico	25
2.2.5 Tratamento.....	27
2.2.6 Imunoprevenção	28
4. CONCLUSÕES	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1. Morfologia de *Haemophilus parasuis* através de microscopia eletrônica 17

3. CAPÍTULO 1

FIGURE 1. Prevalence of *H. parasuis* serovars identified by means of PCR multiplex and a modified indirect hemagglutination when necessary.46

FIGURE 2. Geographic distribution of the most prevalent *Haemophilus parasuis* serovars for each of the ten states.....47

FIGURE 3. Distribution over the years of *Haemophilus parasuis* isolates for the most prevalent serovars which represent 69.9% of them.....48

FIGURE 4. Distribution over the years of *Haemophilus parasuis* isolates for the less prevalent serovars.....49

FIGURE 5. Distribution over the years of *Haemophilus parasuis* isolates with regard to virulence, according to Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992)..50

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

TABELA 1. Vacinas comerciais disponíveis no Brasil para a imunoprevenção das infecções produzidas pelo <i>H. parasuis</i>	28
---	----

3. CAPÍTULO 1

TABELA 1. Anatomical sites and classification of <i>H. parasuis</i> isolated from pigs with Glässer's Disease.....	44
--	----

TABELA 2. Occurrence of <i>H. parasuis</i> serovar isolation according to virulence and site of isolation within pigs affected with Glässer's Disease.....	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CA -	Coaglutinação;
DG -	Doença de Glässer;
ELISA -	Ensaio imunoenzimático;
ERIC-PCR -	Reação em cadeia de polimerase baseada em sequências intergênicas consenso repetitivas em enterobactérias;
HI -	Hemaglutinação indireta;
HIm -	Hemaglutinação indireta modificada;
<i>H. parasuis</i>	<i>Haemophilus parasuis</i> ;
-	
IDGA -	Imunodifusão em gel de ágar;
KRG -	Kielstein-Rapp-Gabrielson;
LPS -	Lipopolissacarídeo;
MEE -	Eletroforese de enzimas <i>multilocus</i> ;
NAD -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo;
NS -	Não-sorotificável;
PCR -	Reação em cadeia da polimerase;
PCRm -	Reação em cadeia da polimerase multiplex;
PCR-RFLP -	Reação em cadeia da polimerase baseada em polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição;
REP -	Padrões de restrições de endonucleases;
qPCR -	Reação em cadeia da polimerase em tempo real;
SRBCs -	Eritrócitos ovinos;
SV -	Sorovar;
UPF -	Universidade de Passo Fundo;

RESUMO

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

DETERMINAÇÃO DOS SOROVARES DE *HAEMOPHILUS PARASUIS* RELACIONADOS COM A DOENÇA DE GLÄSSER NO BRASIL

Autor: Julia Pires Espíndola

Orientador: Rafael Frandoloso

Passo Fundo, 27 de janeiro de 2017

A Doença de Glässer (DG) é uma doença infecciosa, emergente, e de grande importância para a suinocultura mundial. Seu agente etiológico é o *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), uma bactéria Gram negativa, fastidiosa, fenotipicamente heterogênea e que pode desencadear uma importante patologia sistêmica em suínos, caracterizada por poliserosite fibrinosa, poliartrite e meningite. *H. parasuis* é classificado em 15 sorovares (SV), no entanto, um número crescente de cepas não-tipificáveis (NS) e relacionadas à surtos de DG tem emergido, demonstrando a variabilidade genética deste microrganismo. O Brasil destaca-se como um dos principais países nessa cadeia de produção, sendo globalmente, o quarto maior em produção e exportação de carne suína. Apesar desta importância, os estudos relacionados à tipificação de cepas clínicas de *H. parasuis* circulantes no Brasil são escassos e não abordam a distribuição nacional dos sorovares nas principais regiões produtoras de suínos. Em nosso país, a imunoprevenção das infecções produzidas por *H. parasuis* é realizada através de vacinas comerciais baseadas em bacterinas mono e bivalentes, inativadas com formol e potencializadas com adjuvantes aquosos ou oleosos. Devido aos problemas relacionados com a capacidade protetora dessas vacinas, principalmente em razão da grande variabilidade fenotípica dos diferentes sorovares e da escassa ou ausente proteção cruzada conferida por um único sorovar, o isolamento e tipificação de cepas envolvidas em um surto de DG são determinantes para o desenvolvimento de um programa preventivo baseado em vacinação. Em resposta ao cenário nacional exposto acima, apresentamos neste trabalho: os sorovares de *H. parasuis* envolvidos em surtos de DG no Brasil; sua distribuição geográfica; o efeito temporal sobre a prevalência de sorovares; e, o impacto destas informações sobre as atuais estratégias preventivas vacinais utilizadas para prevenção da DG. Para alcançar estes objetivos, 460 cepas clínicas de *H. parasuis* provenientes de dez estados do Brasil, abrangendo as principais regiões produtoras de suínos, foram analisadas. As cepas foram

tipificadas através da técnica de PCR multiplex desenvolvida por Howell et al. (2015) e a diferenciação dos sorovares 5 e 12 foi realizada mediante a técnica de hemaglutinação indireta modificada desenvolvida por Lorenson et al. (2017). Nossos resultados demonstram que a nível nacional os sorovares mais prevalente são SV 4 (26.6%), NS (17.6%), SV 1 (13.1%), SV 14 (12.6%) e SV 5 (10.7%). Considerando-se a virulência dos sorovares, de acordo com a classificação proposta por Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992), mais da metade do total dos isolados pertencem ao grupo dos sorovares altamente virulentos (51.0%) e 31.4% ao grupo dos sorovares moderadamente virulentos. Observamos que as cepas NS foram isoladas fundamentalmente do sistema respiratório, envolvendo pulmões (64.9%), área nasal (13.0%) e traqueia (10.4%). Por outro lado, os sorovares 5 e 14 foram basicamente isolados de cérebro, coração, articulações e líquidos cavitários. Quando relacionados à virulência, 62.5% dos sorovares altamente virulentos foram isolados a partir de locais sistêmicos e os demais procedentes do sistema respiratório. Em relação à distribuição geográfica, observamos a presença dos sorovares 1, 4, 5, 5/12, 14, 15 e NS em praticamente todos os estados analisados. Por outro lado, os sorovares 2 e 13 somente foram detectados em SC, MT e MG, além disso o sorovar 12 ficou basicamente restrito ao RS . Os estados com maior número de amostras analisadas foram MG e SC, fato que pode estar relacionado com as altas densidades de suínos produzidos nestas regiões. Também, verificamos que ao longo da linha temporal dos isolamentos ocorreu entre os anos de 2013 a 2016, um aumento no número de isolados clínicos e entre estes, de cepas altamente virulentas. Em síntese, apresentamos neste estudo, uma atualização dos sorovares de *H. parasuis* associados com a DG no Brasil e, destacamos que as vacinas comerciais disponíveis em nosso país não incluem 76.3% dos sorovares presentes em nossas granjas produtoras de suínos. Desta maneira, o sucesso da prevenção da DG em nosso país em curto prazo está condicionado ao uso de vacinas autógenas e, em longo prazo, a uma atualização da composição antigênica das atuais vacinas comerciais.

Palavras-chave: *Haemophilus parasuis*, sorovares, tipificação molecular, tipificação sorológica, prevalência, Doença de Glässer

ABSTRACT**Master's Dissertation****Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação****Universidade de Passo Fundo****DETERMINATION OF *HAEMOPHILUS PARASUIS* SEROVARS RELATED TO GLÄSSER'S DISEASE IN BRAZIL**

Author: Julia Pires Espíndola

Advisor: Rafael Frandoloso

Passo Fundo, 27 de janeiro de 2017

Glässer's disease (GD) is an emerging bacterial disease of great importance to the world's pig farming. Its etiologic agent is *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), a fastidious, phenotypically heterogeneous Gram negative bacterium that can trigger an important systemic pathology in pigs characterized by fibrinous polyserositis, polyarthritis and meningitis. *H. parasuis* is classified in 15 serovars (SV), however, a growing number of non-typeable (NT) strains and related to outbreaks of GD have emerged, demonstrating the genetic variability of this microorganism. Brazil stands out as one of the main countries in this production chain, being the fourth largest in swine production and exportation. Studies related to typing clinical strains of *H. parasuis* that are circulating in Brazil are scarce, even with its importance, and there are no studies that demonstrate the national screening of distribution of the serovars in the main producing regions of swine. In our country, the immunoprevention of the *H. parasuis* infections relies in commercial vaccines based on monovalent and bivalent bacterins inactivated with formalin and potentiated with aqueous or oily adjuvants. Due to the problems related to the protective capacity of these vaccines, mainly due to the high phenotypic variability of the different serovars of this pathogen and the little or absent cross-protection conferred by a single serovar, isolation and characterization of strains involved in a GD outbreak are determinant for the development of more rational vaccine-based preventive program. In response to the national scenario related to *H. parasuis* and GD, we present here the *H. parasuis* serovars involved in outbreaks of DG in Brazil, their geographic distribution, the temporal effect on the prevalence of serovars, and the impact of these work in the vaccines actually used. To reach these objectives, 460 clinical isolates of *H. parasuis* from ten Brazilian states, covering the main swine producing regions, were analyzed. The strains were typed by multiplex PCR technique developed by Howell et al. (2015), and the differentiation of serovars 5 and 12 was performed using the modified indirect hemagglutination technique

developed by Lorenson et al. (2017). Our results show that the most prevalent serovars are SV 4 (26.6%), NT (17.6%), SV 1 (13.1%), SV 14 (12.6%) and SV 5 (10.7%). Taking into account the virulence of serovars, according to the classification proposed by Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), more than half of all isolates belong to the highly virulent serovars group (51.0%) and 31.4% to the serovars moderately virulent group. We observed that NT strains were fundamentally isolated from the respiratory system, involving lungs (64.9%), nasal area (13.0%) and trachea (10.4%). On the other hand, serovars 5 and 14 were basically isolated from brain, heart, joints and cavitary fluids. When related to virulence, 62.5% of the highly virulent serovars were isolated from systemic sites and the others from the respiratory system. Regarding the geographic distribution, we observed the presence of serovars 1, 4, 5, 5/12, 14, 15 and NS in almost all analyzed states. On the other hand, serovars 2 and 13 were only detected in SC, MT and MG, respectively; in addition, serovar 12 was basically restricted to RS. The states with the highest number of analyzed samples were MG and SC, a fact that may be related to the high densities of pigs produced in these regions. In addition, we observed that the number of field isolates and amongst them of highly virulent strains have increased between 2013 to 2016. In summary, we present an update of *H. parasuis* serovars associated with GD in Brazil, and we highlight that the commercial vaccines available in our country do not include 76.3% of the serovars present on our pig production farms. Thus, the short-term success of GD prevention in our country is conditioned by the use of autogenous vaccines and, in the long term, an update of the antigenic composition of current commercial vaccines.

Key words: *Haemophilus parasuis*, serovars, molecular typing, serological typing, prevalence, Glässer's Disease

1. INTRODUÇÃO

Haemophilus parasuis (*H. parasuis*) é uma bactéria Gram negativa que vem ganhando especial atenção nos últimos anos em todos os países com suinocultura tecnificada. Clinicamente, este patógeno produz uma doença inflamatória sistêmica conhecida como Doença de Glässer (DG), a qual gera importantes perdas econômicas para a indústria do suíno mundialmente.

Morfolologicamente, *H. parasuis* apresenta-se como um cocobacilo pleomórfico e necessita de uma atmosfera microaerófila para seu cultivo *in vitro*, característica semelhante aos dos outros membros da família *Pasteurellaceae* (1, 2). Este microrganismo está distribuído mundialmente e tem produzido importantes surtos de DG em rebanhos livres de patógenos específicos ou em granjas com elevadas condições sanitárias (3). Entre as possíveis causas relacionados aos novos surtos, destaca-se o reduzido desafio natural dos animais e a deficiente aquisição/desenvolvimento de imunidade específica (4).

Considerando que *H. parasuis* coloniza o trato respiratório de suínos já nas primeiras semanas de vida, a principal forma de transmissão é através do contato direto dos leitões com as matrizes, portadoras assintomáticas do microrganismo (5). Por tratar-se de um patógeno fenotipicamente heterogêneo, alguns sorovares de *H. parasuis* podem integrar o microbioma respiratório suíno sem desencadear nenhuma manifestação clínica, por outro lado, cepas com maior virulência, podem migrar para os pulmões, produzindo pneumonia ou alcançar a corrente sanguínea, desencadeando um quadro inflamatório sistêmico composto por poliserosites fibrinosas, poliartrites, meningite. As perdas econômicas geradas pela DG são devido aos altos custos com antimicrobianos, descarte precoce e mortalidade dos animais (5).

H. parasuis é classificado sorologicamente em quinze sorovares (SV) conforme o esquema KRG proposto por Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), entretanto, um número importante de cepas clínicas são antigenicamente diferentes quando comparadas com as cepas/sorovares que formam o painel de referência KRG e são classificadas como não são tipificáveis (NS) (6). O número de cepas NS, utilizando a técnica de hemaglutinação indireta (HI), varia de 15.2% (6) a 44% (7), destacando o potencial limitado das técnicas sorológicas para conduzir a tipificação de *H. parasuis*, possivelmente, em razão da alta variabilidade antigênica deste microrganismo.

Considerando a alta variabilidade fenotípica de *H. parasuis* e, utilizando informações genômicas de todas as cepas de referência de *H. parasuis*, Howell et al. (2015) desenvolveram

um método de tipificação molecular baseado em genes codificantes da cápsula polissacarídica (*capsi loci*) e conseguiram, mediante uma reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, diferenciar 13 dos 15 SVs descritos, tornando o processo de tipificação mais fácil, rápido e reprodutível entre laboratórios de diagnóstico (8).

Devido à insuficiente capacidade protetiva induzida pelas vacinas comerciais, principalmente em razão da grande variabilidade fenotípica dos diferentes SVs de *H. parasuis* e da escassa ou ausente proteção cruzada conferida por um único SV, estudos de isolamento e tipificação de cepas envolvidas em surtos de DG são determinantes para o desenvolvimento de um programa efetivo de imunoprevenção frente a este patógeno.

Neste cenário, quando o serovar envolvido em um surto for diferente daquele (s) incluído (s) nas vacinas comerciais, pode-se optar pela produção de uma vacina autógena, a qual irá conferir imunidade específica contra o SV que está causando o problema na granja. Para o desenvolvimento deste tipo de vacina, alguns critérios com relação ao antígeno vacinal deverão ser criteriosamente seguidos, por exemplo: utilizar preferencialmente cepas isoladas de meninges; em segundo plano, utilizar cepas isoladas de articulações e de outros locais sistêmicos; e, por último, evitar a utilização de cepas procedentes de pulmões, devido a alta heterogeneidade (4, 5). Considerando estas premissas, observamos uma conduta equivocada no desenvolvimento de vacinas autógenas contra *H. parasuis* no Brasil, já que mais de 90% das vacinas utilizam cepas isoladas do ambiente pulmonar (dados não publicados).

Em virtude da importância do monitoramento dos sorovares de *H. parasuis*, países com expressiva produção de suínos mantém a distribuição e a prevalência dos sorovares atualizadas. Na maioria dos países onde realizou-se o monitoramento dos SVs circulantes, como Alemanha, China, Espanha, Estados Unidos da América, Austrália, Dinamarca e Holanda, os SVs 4 e 5, seguidos por SV 13 ou cepas NS (9-13) foram os mais prevalentes.

Contudo, no Brasil, existem poucas informações sobre a distribuição dos diferentes sorovares de *H. parasuis* associados a DG, particularmente na região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) onde são produzidos 80.3 % da carne suína exportada (14). Na região centro-oeste do país, onde a maior parte dos trabalhos de tipificação de *H. parasuis* foram realizados, observa-se a circulação mais prevalente do SV 4 (15), no entanto, devido à sensibilidade e especificidade da técnica utilizada (IDGA - Imunodifusão em Gel de Ágar), muitas amostras não puderam ser tipificadas. Outro aspecto importante e que deve ser levado em consideração durante a leitura dos trabalhos realizados no Brasil, é a inclusão de um reduzido número de isolados clínicos procedentes de todos os estados

produtores de suínos do Brasil, não permitindo aos autores demonstrarem o cenário nacional da distribuição dos sorovares de *H. parasuis* (15-19).

Em base a este breve histórico, nesta dissertação, apresentamos um robusto estudo de tipificação molecular de 460 cepas clínicas de *H. parasuis* procedentes de surtos de DG diagnosticados em 10 estados brasileiros. Nossos resultados demonstram a distribuição nacional dos diferentes sorovares de *H. parasuis* circulantes em todos os estados com produção de suínos. Por último, demonstramos uma realidade preocupante com relação ao uso das atuais vacinas comerciais disponíveis para a prevenção das infecções produzidas por *H. parasuis* em nosso país.

O delineamento experimental, materiais e métodos, resultados e discussão desta dissertação encontram-se no capítulo I, apresentado na forma de um artigo científico e intitulado “Evidence that the most isolated *Haemophilus parasuis* serovars are absent in commercial vaccines composition in Brazil”.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HAEMOPHILUS PARASUIS

2.1.1 Aspectos históricos de *H. parasuis* e da Doença de Glässer

No início do século XIX, Glässer (1910) descreveu uma patologia suína caracterizada por um quadro inflamatório sistêmico associado à presença de um pequeno bacilo Gram negativo. Anos mais tarde, Hjärre and Wramby (1943) iniciaram a caracterização bioquímica do microrganismo e o nomearam, inicialmente, de *Haemophilus suis*, devido a sua necessidade dos fatores V (nicotinamida adenina dinucleotídeo, NAD) e X [ferro porfirina (heme)] da coagulação do sangue para seu crescimento *in vitro*. Quase duas décadas depois, Lecce (1960) propôs uma modificação na nomenclatura do patógeno, passando a chamá-lo de *Haemophilus influenzae suis*, o qual foi atualizado definitivamente por Biberstein and White (1969), após demonstrarem que o microrganismo dependia apenas de NAD (fator V). Levando em consideração a nomenclatura existente do gênero *Haemophilus*, estes dois autores adicionaram na denominação de espécie o prefixo “para”, utilizado para descrever microrganismos que não necessitam do fator X. A partir de então, *Haemophilus parasuis* passou a ser a nomenclatura consenso entre os microbiologistas veterinários para descrever o pequeno bacilo Gram negativo causador da Doença de Glässer (1, 3).

Além disso, mesmo não existindo uma alta homologia entre os ácidos nucleicos de *H. parasuis* em relação às outras espécies do gênero *Haemophilus*, sua posição taxonômica permanece dentro da família *Pasteurellaceae* (3).

2.1.2 Morfologia

Morfologicamente, *H. parasuis* apresenta-se como um pequeno cocobacilo Gram negativo (1) de 1 a 7 µm de comprimento e 0.2 a 0.7 µm de largura (13), altamente polimórfico, especialmente quando estudado através de microscopia eletrônica de varredura (fig. 1). Conforme representado na figura 1, esta bactéria pode apresentar-se basicamente de duas formas: (A) como um cocobacilo único ou, (B) formando longas cadeias filamentosas.

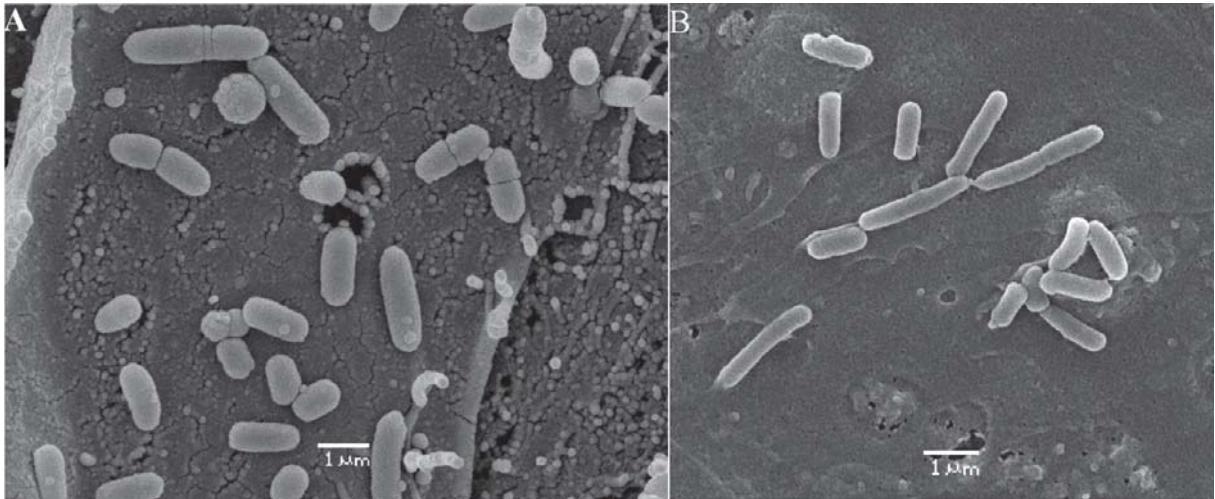


Figura 1. Análise morfológica de *Haemophilus parasuis* através de microscopia eletrônica de varredura. (A) A cepa Nagasaki (SV5) de *H. parasuis* é constituída por clones bacterianos pleomórficos, que se apresentam predominantemente como bacilos curtos. Por outro lado, (B) os clones da cepa SW124 (SV4) apresentam-se como bacilos mais alongados, no entanto, observa-se também a presença de bacilos curtos e medianos (20, 21).

2.1.3 Cultivo *in vitro* de *H. parasuis* e características bioquímicas

H. parasuis é um microrganismo fastidioso, de crescimento lento e dependente da presença de NAD. Diversos meios de cultivo enriquecidos com este composto podem ser utilizados para o cultivo deste patógeno, entre eles, destacam-se o ágar chocolate, ágar Nicolet e ágar ou caldo PPLO (*pleuropneumonia like-organism*) suplementado com NAD (0,025%) e com 10% de glicose. Ainda existe a possibilidade de utilizar ágar sangue contendo uma estria central de *Staphylococcus aureus* (produtor de NAD) e sob este meio, *H. parasuis* crescerá ao redor da estria, desencadeando um fenômeno chamado de “satelitismo”(22). Em grande escala, *H. parasuis* pode ser cultivado em meio líquido composto por extrato de levedura (43,55 g/L), cloreto de sódio (1,05 g/L), tampão fosfato [11,63 % (v/v)], soro bovino (10 %) e NAD (20 µg/L) (23).

As condições ideais para o cultivo deste patógeno devem contemplar uma temperatura de 37°C e um período de incubação que varia de 24 a 48 horas em atmosfera contendo 10% de CO₂ (microaerofilia) (24). Em relação à identificação bioquímica, *H. parasuis* é oxidase negativa, catalase positiva, urease negativa, reduz nitrato, não produz indol e fermenta glicose, galactose, manose, frutose, sacarose e maltose (25).

2.1.4 Isolamento

O isolamento de *H. parasuis* depende da correta seleção dos animais bem como, do procedimento de coleta. Alguns critérios devem ser levados em consideração no momento da coleta, como por exemplo: os suínos não podem ter recebido tratamento com antimicrobianos, por pelo menos uma semana; e, os animais devem estar vivos ou sofrido eutanásia no momento da coleta. Recomenda-se o uso de *swabs* estéreis coletados de locais sistêmicos como articulações, meninges e pericárdio, da forma mais asséptica possível. Órgãos sólidos, como pulmões, também podem ser enviados (4). Exsudatos acumulados no saco pericárdico ou na cavidade torácica e abdominal, podem ser coletados em seringas estéreis e enviados ao laboratório. As amostras devem estar devidamente identificadas e acondicionadas de modo que não haja contato direto com possíveis contaminantes. Caixas térmicas limpas (4 - 8 °C) devem ser utilizadas e as amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível.

No laboratório as amostras são normalmente semeadas em placas de Ágar chocolate para isolamento inicial e, após crescimento de colônias pequenas e translúcidas suspeitas de *H. parasuis*, inicia-se a caracterização fenotípica do microrganismo (26). Devido ao crescimento lento e possíveis contaminações por outros patógenos respiratórios ou ambientais, meios de cultivos seletivos contendo bacitracina (2 µg/mL) podem ser utilizados, já que cepas de *H. parasuis* demonstram ter resistência genômica a este antimicrobiano (27).

2.1.5 Tipificação de *H. parasuis*

2.1.5.1 Métodos sorológicos

O processo de tipificação de *H. parasuis* iniciou em 1955, quando Bakos, et al. (1955), através de um teste de precipitação de antígenos, propuseram os quatro primeiros sorovares de *H. parasuis*, nomeados de A, B, C e D. Anos mais tarde, 34 cepas de *H. parasuis*, incluindo 4 cepas previamente tipificadas por Bakos, foram avaliadas empregando-se um conjunto de técnicas imuno-sorológicas, e uma nova classificação sorológica foi proposta, chegando a 7 sorovares e nos 5 primeiros sorovares de referência, representados pelas cepas n°4 (SV1), SW140 (SV2), SW114 (SV3), SW124 (SV4) e Nagasaki (SV5) (28). Outros 7 sorovares (designados de Jena 6 – 12) foram propostos por Kielstein et al. (1991), e mais cinco (ND1-ND5) ainda foram descritos (6, 29).

Em 1992, Kielstein e Rapp-Gabrielson reuniram todas as informações relacionadas com os estudos de sorotipificação de *H. parasuis* existentes e propuseram um esquema para a classificação definitiva deste patógeno em 15 sorovares, baseando-se nos resultados obtidos com o uso da técnica de IDGA utilizando antígenos termicamente estáveis. A classificação proposta por estes autores continua sendo mundialmente aceita e é conhecida como esquema Kielstein-Rapp-Gabrielson (KRG) (6).

Apesar da técnica de IDGA ser o método padrão para tipificação de *H. parasuis*, um alto número de cepas não podem ser tipificadas devido ao baixo poder resolutivo desta técnica. Ao observarem esta limitação, em 2003, Del Rio et al., propuseram a Hemaglutinação Indireta como uma metodologia alternativa para a sorotipificação de *H. parasuis*. Esta técnica, baseia-se na adsorção de antígenos de *H. parasuis* na superfície dos eritrócitos ovinos (SRBCs) os quais servem de reveladores da interação entre os antígenos e anticorpos específicos (12). Neste teste, utilizam-se antígenos termo-resistentes ou extratos salinos, compostos basicamente por estruturas lipopolissacarídicas. Os resultados destes autores demonstraram que a HI era capaz de designar um sorovar específico à 91% das cepas clínicas analisadas, resultado muito superior quando comparado com aqueles obtidos pelo teste de coaglutinação (63%). No mesmo ano, Tadjine et al. (2004) também demonstraram que a HI apresentava um poder resolutivo superior ao teste de IDGA, propondo que esta técnica deveria ser utilizada sempre que os resultados do teste de IDGA fossem duvidosos devido às reações cruzadas entre alguns sorovares de *H. parasuis* (7, 30).

Em nosso laboratório, observamos que a técnica clássica de HI apresentava uma limitação em relação a sua reprodutibilidade, especialmente, por não dispormos de reagentes comerciais e padronizados para a realização deste teste. Inúmeros estudos foram conduzidos com o propósito de aumentar a capacidade dos eritrócitos ovinos de adsorver um número maior de antígenos de *H. parasuis* e, conseqüentemente, de aumentar a capacidade de tipificação específica desta técnica. Os resultados deste estudo, recentemente publicados, demonstram que a adsorção constante de antígenos de *H. parasuis* na superfície de eritrócitos ovinos somente é efetiva se os eritrócitos forem tratados previamente com ácido tânico. Neste método, denominado Hemaglutinação Indireta Modificada (HIM), 76% das cepas clínicas analisadas foram tipificadas (19).

A tipificação de *H. parasuis* é determinante para o entendimento das características do agente que está causando um surto de Doença de Glässer (DG), já que existe uma relação bem estabelecida entre os sorovares e suas respectivas virulências. Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992) avaliaram a capacidade dos 15 sorovares de referência de reproduzir a DG em leitões

livres de patógenos específicos (SPF) e considerando os sinais clínicos observados, classificaram os sorovares em três categorias. Os sorovares 1, 5, 10, 12, 13, 14 foram classificados como altamente virulentos devido à alta morbidade e mortalidade, os sorovares 2, 4, 8 e 15 como moderadamente virulentos, e os sorovares 3, 6, 7, 9, 11 foram descritos como pouco virulentos ou avirulentos, por não induzirem sinais clínicos da doença. Além disso, foi reportada a associação entre os sorovares 1, 2, 4, 5, 12, 13 e 14 e algumas cepas NS, com isolamento em locais sistêmicos e a presença do sorovar 3 e cepas NS no trato respiratório superior (6, 31).

Embora existam quinze sorovares de referência descritos, um alto número de cepas clínicas não podem ser enquadradas fenotipicamente no painel de referência do esquema KRG, chamando a atenção para a alta heterogeneidade superficial deste patógeno e muito provavelmente, para a existência de um número maior de sorovares.

2.1.5.2 Métodos moleculares

Um número crescente de métodos moleculares tem sido utilizados para definir a heterogeneidade de isolados clínicos de *H. parasuis* e avançar em questões epidemiológicas das infecções produzidas por este patógeno. Em 1988 utilizou-se pela primeira vez a técnica de digestão de DNA com endonucleases para gerar padrões de restrição (REP ou REF) e avaliar assim, a ocorrência e a distribuição de cepas de *H. parasuis* procedentes de granjas SPF e de convencionais, demonstrando a presença de padrões de restrição mais heterogêneos nas cepas das granjas convencionais em comparação com as SPF (32). Em outro estudo, utilizando a técnica de eletroforese com enzimas *multilocus* (MEE) confirmou-se a heterogeneidade existente entre cepas desta espécie bacteriana (33).

Outros autores aplicaram a técnica de ERIC-PCR (reação em cadeia de polimerase baseada em sequências intergênicas consenso repetitivas em enterobactérias) para determinar o número de cepas diferentes envolvidas em um surto de DG e direcionar a seleção de cepas para o desenvolvimento de vacinas autógenas. Uma das principais vantagens da ERIC-PCR é sua capacidade de diferenciar cepas de um mesmo sorovar ou a partir de um grupo de cepas NS (31, 34). Outro método alternativo para tipificação de *H. parasuis* é a PCR-RFLP (reação em cadeia de polimerase baseada em polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) baseada no gene *tbpA* (*transferrin-binding protein A*). Através deste método, é possível enquadrar as 15 cepas de referência em 12 perfis diferentes (35).

Embora seja evidente a contribuição dos estudos moleculares citados acima, em 2015 apresentou-se uma nova ferramenta molecular aplicada à tipificação deste patógeno, sendo esta altamente sensível. Neste estudo foram analisadas as sequências dos genes envolvidos na biosíntese das estruturas polissacarídeas, como LPS (lipopolissacarídeo) ou a cápsula (variações no *capsi loci*) de todos os sorovares de referência de *H. parasuis* e, encontraram-se sequências nucleotídicas em genes homólogos que permitiam a diferenciação de quase todos os sorovares deste patógeno. Com base nestas observações, Howell et al. (2015) desenharam uma PCR multiplex que permite a diferenciação rápida e altamente específica de 13 dos 15 sorovares existentes atualmente. Este método demonstrou vantagens em relação ao tempo do diagnóstico, acurácia do teste, repetitividade e facilidade de difusão da técnica, além de diminuir o número de cepas NS (8).

2.2 HAEMOPHILUS PARASUIS E A DOENÇA DE GLÄSSER

2.2.1 Epidemiologia

H. parasuis é o agente etiológico da Doença de Glässer (DG), uma enfermidade bacteriana emergente que acometem suínos e que produz importantes perdas econômicas para a suinocultura. *H. parasuis* possui distribuição mundial e vem produzindo de forma crescente surtos da DG, principalmente em granjas com alto padrão sanitário e em rebanhos SPF. Além do alto potencial virulento de alguns sorovares, outras causas podem estar relacionadas com o aumento de surtos de DG, entre elas, o reduzido desafio natural dos animais e a deficiente aquisição de imunidade natural específica (4, 6).

Por tratar-se de um patógeno que coloniza o trato respiratório de leitões durante as primeiras semanas de vida, a principal forma de transmissão de *H. parasuis* é através do contato direto entre a matriz e os leitões recém-nascidos, acometendo principalmente suínos de 6 a 12 semanas. O desenvolvimento da doença ocorre principalmente no momento do decréscimo dos anticorpos maternos transferidos pelo colostro procedentes de mães vacinadas ou naturalmente expostas ao patógeno (4). Em relação às perdas econômicas geradas por conta da DG, destacam-se os altos custos com antimicrobianos, descarte precoce e mortalidade dos animais (5).

2.2.1.1 Distribuição dos sorovares

O conhecimento da epidemiologia de *H. parasuis* é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de prevenção frente às infecções produzidas por este patógeno. Nesse sentido, estudos relacionados com a prevalência e distribuição de sorovares de *H. parasuis* em regiões produtoras de suínos de diversos países já foram realizados em diversos países, demonstrando a circulação de um grupo heterólogo de sorovares, no entanto, os sorovares 4 e 5 são os mais prevalentes na maioria dos países com alta produção de suínos. Esta informação pode ser utilizada para justificar o uso de cepas destes dois sorovares na composição das atuais vacinas comerciais de distribuição mundial (10, 36-38). No entanto, o número de cepas clínicas analisadas em todos estes estudos (~ 100) pode não ser suficiente para demonstrar a real distribuição dos sorovares relacionados com a DG. Ainda, cabe destacar, que todos estes estudos foram realizados utilizando as técnicas de IDGA e HI, as quais possuem certas limitações para a tipificação de *H. parasuis* resultados em altas porcentagens de amostras NS (20-30%) (30, 37).

Em relação a distribuição epidemiológica de *H. parasuis*, observa-se que na Espanha e na China, o SV 5 é mais prevalente, seguido pelo SV 4 com 29,3% e 20% de NS, respectivamente (36, 37). O mesmo padrão é descrito na Austrália e Dinamarca com exceção do SV4; nestes países, o SV 5 é o mais prevalente, seguido pelo SV 13 e por cepas NS (15%) (10, 38). Na Holanda e na Itália, o SV 4 é mais prevalente, seguido pelo SV 13 e com uma média de 26% de cepas NS (11, 39). Nos Estados Unidos da América (EUA) e no Canadá, o SV 4 apresenta-se como o mais prevalente, seguido pelos SV 12 e SV 5, respectivamente. Ainda, nos EUA, 27 % das cepas analisadas foram NS (30, 31).

2.2.1.2 Cenário Brasileiro

O Brasil não dispõe de muitos estudos sobre a distribuição ou prevalência dos sorovares de *H. parasuis*. Os trabalhos existentes foram realizados com um número reduzido de isolados de *H. parasuis* e não contemplaram todas as regiões produtoras de suínos do país. Santos et al. (1997), tipificaram 321 isolados clínicos de *H. parasuis* e demonstraram a alta prevalência dos sorovares 1, 4, 5 e 12 (16). Macedo et al. (2011) sorotipificaram através da técnica de IDGA, 63 isolados provenientes de 17 granjas de 5 estados (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo), entre os anos de 2000 e 2007 e,

descreveram a presença de 8 sorovares diferentes (SV 1, 2, 4, 5, 6, 9, 12 e 14). O SV 4 (15,9%) foi o mais prevalente e um número expressivo de amostras NS foi encontrado (60,3%). Utilizando a mesma técnica, Moreno et al. (2011), tipificaram 50 isolados procedentes de 21 granjas da região centro-oeste e o SV 4 (24%) foi o mais prevalente, seguido do SV 14 (14%), SV 5 (12%), SV 13 (8%) e por último o sorovar 2 (2%), entretanto, 40% das amostras foram NS. Aplicando a mesma técnica de IDGA, 40 isolados de 17 pulmões provenientes de 16 granjas da mesma região foram tipificados, e o SV 4 foi, novamente, o mais prevalente (26,1%), seguido pelos SV 5 (17,4%), SV 14 (8,7%), SV 13 (4,4%) e SV 2 (4,4%), ainda assim, 39% das amostras foram NS (15, 17, 18).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs a técnica de HIm, e demonstrou a circulação no estado do Rio Grande do Sul dos SV 4 e SV 5 (ambos 20%), seguidos pelo SV 1 (14%), SV 12 (12%), SV 14 (6%) e SV 2 (4%). Entretanto, 24% das amostras não puderam ser tipificadas mediante esta técnica (19).

2.2.2 Patogênese

A cinética do processo de infecção produzido pelo *H. parasuis* ainda não está bem elucidada e estudos propõem que o início da colonização seja no sistema respiratório superior dos suínos, já que este patógeno pode ser isolado da cavidade nasal e da traqueia de animais saudáveis e doentes (40). Com o propósito de entender a dinâmica do processo de infecção, Vahle et al. (1995) inocularam experimentalmente uma cepa virulenta de *H. parasuis* em suínos privados de colostro materno pela via intranasal e acompanharam a evolução clínicas dos animais, bem como, coletaram amostras para proceder o isolamento do patógeno em diferentes momentos após a infecção. Os resultados destes autores demonstram o potencial invasivo e de rápida disseminação de *H. parasuis*, sendo possível isolá-lo da corrente circulatória e de tecidos sistêmicos 36 horas após a infecção (41).

Inicialmente, *H. parasuis* se adere às células das mucosas respiratórias e, dependendo do sorovar, migra ao ouvido médio ou à traqueia e, em ambos tecidos, produz inflamação local, podendo ser esta alteração a possível porta de entrada do patógeno ao sistema circulatório (42). Uma vez na circulação, *H. parasuis* pode ser encontrado em diversos órgãos e tecidos sistêmicos, como cérebro, fígado, baço, pulmão, pleura, líquido pericárdico, líquido peritoneal, articulações (carpo e tarso) (43). Alterações nas mucosas também são consideradas um fator predisponente para a entrada do patógeno, assim como infecções concomitantes (3).

2.2.3 Quadro clínico

São descritas quatro formas clínicas associadas com a infecção por *H. parasuis*: a primeira, considerada a forma clássica da DG, que se caracteriza por exsudação serofibrinosa e purulenta envolvendo qualquer superfície serosa (poliserosite), incluindo membrana sinovial, peritônio, pleura, pericárdio e meninges; a segunda, relacionada à septicemia sem poliserosite; a terceira, relacionada à miosite aguda (do músculo masseter); e a quarta, que cursa com doença respiratória (pneumonia) em que *H. parasuis* pode ser o agente primário ou secundário (2, 44).

Os sinais clínicos que podem ser observados inicialmente são inespecíficos, como o aumento da temperatura corporal, apatia e inapetência. Esta doença geralmente apresenta um curso agudo e no seu decorrer pode-se perceber tosse, dispneia, perda de peso, articulações inchadas, laminite, decúbito, incoordenação, tremores e cianose, podendo ser seguido de morte. A forma crônica resulta em animais refugos, que além de sinais respiratórios, apresentam pelo arrepiado e sem brilho (3)

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico clássico da DG é fundamentado no histórico, sinais clínicos, lesões encontradas na necropsia e no isolamento bacteriano (42). No entanto, devido às características fastidiosas desse microrganismo, diversas ferramentas imunológicas e moleculares estão disponíveis e devem ser utilizadas para o correto diagnóstico.

2.2.4.1 Lesões macroscópicas

As principais lesões encontradas nas necropsias de animais infectados com *H. parasuis* são exsudatos serofibrinosos ou fibrinopurulentos em uma ou múltiplas superfícies serosas, incluindo peritônio, pericárdio, pleura, articulações e nas meninges (45). No exame histopatológico, esses exsudatos são compostos por fibrina, neutrófilos e macrófagos. Em casos mais graves da doença é possível encontrar meningoencefalite, aumento do líquido cerebrospinal e artrite, além disso, em casos de septicemia, petéquias e equimoses são observados nos rins, fígado e cérebro, além de sinais de cianose (41). Lesões compatíveis com

pneumonia geralmente não são observadas e edemas pulmonares e subcutâneos são menos frequentes (4, 43).

2.2.4.2 Isolamento a partir de amostras clínicas

Como já comentado, o diagnóstico clássico de *H. parasuis* é confirmado com o isolamento do patógeno a partir de amostras clínicas, mas por diversas vezes pode ser dificultado por seu crescimento fastidioso e contaminações por outros patógenos de crescimento rápido. Apesar disso, o isolamento de cepas em granjas onde estejam ocorrendo surtos desse patógeno possibilita a produção de vacinas autógenas, uma estratégia preventiva específica para o sorovar que está causando mortalidade ou perdas produtivas. Ainda, existe a possibilidade de isolar mais de um sorovar de *H. parasuis* de um mesmo rebanho, bem como, isolar cepas de amostras respiratórias de suínos saudáveis. Levando isso em consideração, recomenda-se que as cepas clínicas para o desenvolvimento de vacinas autógenas sejam provenientes de meninges; isolados de articulações e locais sistêmicos são menos indicados e, cepas procedentes de pulmões não devem ser utilizadas na formulação de vacinas autógenas devido a sua alta heterogeneidade (4, 5).

2.2.4.3 Métodos sorológicos

Podem ser empregados diferentes métodos sorológicos para detecção de anticorpos frente ao *H. parasuis*, Nielsen et al. (1993) e Takahashi et al. (2001) utilizaram o teste de fixação do complemento, enquanto outros autores desenvolveram testes de hemaglutinação indireta e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (27, 46-48). Entretanto, estes foram reportados como imprecisos e inespecíficos. Diante disso, um teste de ELISA baseado numa proteína imunodominante e conservada em todos os 15 sorovares de *H. parasuis*, chamada OppA, foi recentemente desenvolvido. Sorologicamente, este ELISA foi capaz de detectar IgGs de suínos infectados experimentalmente com *H. parasuis*, no entanto, soro de animais infectados com outros patógenos, bem como, procedente de animais com *H. parasuis* sem infecção sistêmica, não apresentaram anticorpos anti-OppA. Os resultados deste estudo destacam a especificidade do teste e sugerem o uso deste ELISA para o monitoramento das infecções por *H. parasuis* em granjas (49).

2.2.4.4 Métodos moleculares

A introdução de métodos moleculares foi um grande avanço no diagnóstico de doenças infecciosas, principalmente em relação ao diagnóstico de patógenos fastidiosos. Inicialmente foi desenvolvida uma reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para amplificação de um fragmento de 812 pb do gene 16S rRNA, com alta sensibilidade (detecção de 10^2 UFC/mL) e demonstrando-se útil para a identificação de *H. parasuis* a partir de amostras clínicas (50). Com o intuito de superar algumas limitações relacionadas à especificidade da técnica anterior, redesenharam a PCR baseada no gene 16S rRNA e conseguiram obter 100% especificidade, convertendo este novo protocolo em mais apropriada para o uso diagnóstico, principalmente para a análise de swabs nasais com propósito de verificar a presença deste patógeno em granjas (51).

Em 2010, Turni et al. (2010) validaram uma PCR em Tempo Real (RT-PCR) baseada no gene *infB* altamente específica e mais sensível que as PCRs convencionais disponíveis para o diagnóstico de *H. parasuis*. Ainda, Frandoloso et al. (2012) demonstram a aplicação desta RT-PCR para rastrear a presença de DNA de *H. parasuis* em diversos tecidos procedentes de suínos experimentalmente infectados com a cepa *Nagasaki* (52, 53). Além disso, Howell (2015), apresentaram em seu recente trabalho, um novo par de primers específico para a espécie *parasuis*.

2.2.5 Tratamento

2.2.5.1 Uso de antimicrobianos

Antimicrobianos são utilizados para o controle e tratamento de suínos com DG (54). A terapia antimicrobiana deve ser instituída o mais rápido possível após a manifestação dos sinais clínicos. Altas doses de antimicrobianos, aplicadas pela via parenteral, são necessárias para que o antimicrobiano possa alcançar órgãos parenquimatosos, articulações e líquido cefalorraquidiano, locais onde possivelmente o microrganismo estará presente (22). O uso profilático (terapia oral) com antibióticos possui pouco valor em surtos de *H. parasuis* (4).

O uso indiscriminado de antimicrobianos, principalmente em estratégias preventivas, tem selecionado clones bacterianos resistentes à alguns antimicrobianos. O contínuo

aparecimento de cepas resistentes dificulta prever a eficácia de qualquer molécula sem a realização de teste de suscetibilidade. Desta maneira, o conhecimento do padrão de suscetibilidade de *H. parasuis* aos agentes antimicrobianos comerciais é indispensável, sendo recomendada a realização do teste de suscetibilidade previamente a qualquer tratamento (54, 55). Dado a importância deste monitoramento, países como a Dinamarca (55), Austrália (56), Espanha (54), Reino Unido (54) e, recentemente, o Brasil (27), tem determinado o perfil de suscetibilidade de cepas clínicas de *H. parasuis*.

Neste cenário, o nosso grupo de pesquisa analisou o perfil de susceptibilidade de 50 cepas clínicas isoladas de granjas localizadas na região sul do Brasil frente a um painel composto pelos principais antimicrobianos utilizados na rotina das granjas da região, demonstrando a existência de resistência, principalmente frente à gentamicina, lincomicina, bacitracina e tiamulina. Entretanto, a maioria dos antimicrobianos utilizados na clínica de suínos apresentaram-se totalmente (cepas sensíveis) ou parcialmente (cepas com sensibilidade intermediária) efetivos, como ampicilina, clindamicina, neomicina, penicilina, danofloxacina e enrofloxacina. Estes resultados destacam a necessidade e a importância do teste de suscetibilidade antes do início do tratamento com antimicrobianos, procedimento que pode minimizar ou evitar o surgimento de novas cepas resistentes no país (27).

2.2.6 Imunoprevenção

O controle das infecções causadas pelo *H. parasuis* é realizado com o uso de vacinas e mediante terapias baseadas em antimicrobianos. Na prática, surtos de DG não são raramente encontrados em rebanhos vacinados ou que estejam recebendo antibiótico-terapia preventiva, causando importantes perdas econômicas para o setor. A razão destes surtos está relacionada com falhas na cobertura vacinal e à presença de cepas com resistência aos antimicrobianos, sendo estes os mais importantes desafios encontrados pelos médicos veterinários envolvidos na clínica de suínos (4).

A vacinação apresenta-se como a principal forma de prevenção. Embora, os fatores de virulência de *H. parasuis*, bem como seus antígenos imunoprotetores não estejam totalmente elucidados, é bastante aceito que exista imunidade específica à cada um dos 15 sorovares e, possivelmente, esteja relacionada com a composição capsular desde sorovares. Um dos principais esforços da indústria farmacêutica veterinária consiste no desenvolvimento de uma vacina que garanta imunidade cruzada protetora, cobrindo a grande variabilidade fenotípica

das cepas clínicas relacionadas com a DG. Atualmente, as vacinas globais são formuladas com *H. parasuis* inativado ou atenuado, garantido uma forte proteção frente ao desafio produzido por sorovares homólogos, no entanto, resultados inconsistentes são observados quanto ao desenvolvimento de proteção cruzada (4).

Proteção cruzada entre diferentes sorovares e mesmo entre isolados de um mesmo sorovar é variável e difícil de prever com precisão (57). Rapp-Gabrielson et al. (1997) estudaram a proteção cruzada entre os sorovares 2, 4, 5, 12, 13 e 14 e, seus resultados demonstraram que suínos imunizados com o SV 4 apresentavam proteção contra o desafio homólogo e contra o SV 5. Entretanto a cepa do SV 5 conferiu apenas proteção homóloga (4).

Em relação a vacinas inativadas, Takahashi et al., 2001 conduziram um estudo demonstrando a falta de proteção cruzada entre os sorovares 2 e 5. Entretanto, essa bacterina bivalente demonstrou suficiente proteção com o desafio homólogo, mas não demonstrou proteção heteróloga contra os demais sorovares (4, 48). Bak and Riising (2002) avaliaram o desenvolvimento de imunidade específica em suínos vacinados com o SV 5, e demonstraram proteção contra o desafio homólogo e parcial proteção frente a desafios heterólogos (sorovares 1, 12, 13 e 14) (57). No desafio heterólogo os animais demonstraram sinais clínicos e lesões, mas não houve mortalidade. Xue et al., (2015) demonstraram a capacidade protetora de uma vacina trivalente composta pelos sorovares 4, 5 e 12 e potencializadas com o adjuvante Montanide GEL 01. Neste estudo 100% dos animais vacinados sobreviveram ao desafio realizado com as cepas homólogas contidas na vacina (58).

Comercialmente, as vacinas disponíveis para fazer frente às infecções produzidas pelo *H. parasuis* são formuladas com microrganismos inativados com formol e potencializadas com adjuvantes clássicos. No Brasil existem quatro vacinas comerciais disponíveis, quatro baseadas no sorovar 5 e uma incluindo os sorovares 1 e 6, conforme tabela 1.

Tabela 1. Vacinas comerciais disponíveis no Brasil para a imunoprevenção das infecções produzidas pelo *H. parasuis*.

Nome comercial	Sorovar	Adjuvante	Marca
Porcilis Glässer	SV 5 (cepa 4800)	Diluvac Forte (Vitamina E)	MSD
Hiprasuis® Glässer	SV 1 e SV 6	*	HIPRA
Parapleuro Shield P	*	Hidróxido de alumínio	Novartis/Elanco
Ingelvac® HP-1	*	Impran® Plus adjuvant (água em óleo)	Boehringer Ingelheim / Merial

* Não revelado

Com exceção da vacina Porcilis Glässer (43, 57), não existem dados disponíveis na literatura relacionados com a eficácia das demais vacinas, tornando muito difícil a decisão do Médico Veterinário na hora de escolher uma vacina. Por outro lado, torna-se evidente a situação confortável da indústria farmacêutica veterinária, a qual não se sente obrigada a demonstrar o perfil de proteção homólogo e heterólogo do seu produto comercial.

Paralelamente ao cenário comercial e, por conta das constantes falhas de proteção conferidas pelas vacinas comerciais, especialmente quando a granja está infectada por um sorovar diferente daquele contido na vacina, emerge aceleradamente o mercado das vacinas autógenas. Neste tipo de vacina, o isolamento do microrganismo de sítios sistêmicos, especialmente a partir das meninges é determinante para conseguir uma ótima proteção da granja (5, 32). Por outro lado, por tratar-se de um produto customizado, converte-se em um biológico mais caro e que demanda de tempo (normalmente entre 30 - 45 dias) para chegar à granja.

Cientificamente, diversos grupos de pesquisa estão trabalhando para encontrar uma vacina capaz de conferir ampla proteção heteróloga contra todos os sorovares de *H. parasuis* (43). Neste cenário, vacina-fantasma (bacterina sem ácidos nucléicos) (59), atenuada geneticamente (60), baseada em DNA (61) ou em proteínas recombinante (TbpB) tem sido avaliadas (43).

Além da classe de vacina, outro fator importante consiste em definir o melhor momento para administrar as vacinas. Esta preocupação está relacionada com a imunidade passiva específica transmitida através do colostro da matriz para os leitões, podendo interferir negativamente na formação da imunidade ativa (57). Oliveira e Pijoan (2002) confirmaram que a imunidade colostrar (matrizes vacinadas) e vacinação dos leitões com duas doses induzem suficiente proteção (5).

Evidence that most of the isolated *Haemophilus parasuis* serovars are absent in commercial vaccine composition in Brazil

Julia Pires Espíndola¹ and Rafael Frandoloso^{1*}

(Article is going to be submitted to Plos One)

¹Laboratory of Microbiology and Advanced Immunology, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil;

*Corresponding author:

E-mail: rfran@upf.br (RF)

Abstract

Glässer's disease (GD) is an important infection disease of swine caused by *Haemophilus parasuis*. This pathogen is in a long time classified in fifteen serovars; however, a high number of isolates are non-typeable (NT) in regards to the reference strains. Vaccination is the major practice used to prevent the *H. parasuis* infection worldwide, but in many countries the available vaccines do not induce acceptable protection against the field strains, mainly because the serovars present in them are different of those isolated from the farms. So, the identification of the serovars of *H. parasuis* involved in a GD outbreak is crucial for designing a rational vaccination program. In this study, 460 field strains of *H. parasuis* isolated from lungs, heart, brain, articulations or trachea of swine from ten different states of Brazil were typable using the combination of a multiplex PCR technique and a modified hemagglutination indirect test. In Brazil, the field strains belonging to the serovar 4, NT and serovar 1, were the most prevalent comprising more than half of the isolates, followed by serovars 14, 5, 5/12, 15, 12, 2 and 13. Dependence between serovar and virulence as well as in regard to serovar and site of isolation were observed. NT isolates were mainly related to respiratory samples, while the serovars 4, 5 and 14 were associated to systemic outbreaks. Our results shown that the vaccines commercially available in Brazil (containing serovar 5 or alternatively serovars 1 + 6) do not include the most prevalent *H. parasuis* serovars related with the GD in our country.

Introduction

Haemophilus parasuis (*Hps*) is a pleomorphic, NAD-dependent Gram-negative bacterium of the family *Pasteurellaceae* [1]. *Hps* colonizes early the respiratory tract causing Glässer's disease (GD), which is characterized by fibrinous polyserositis, polyarthritis, meningitis and pneumonia [2]. GD has been responsible for high mortality rates in swine industry worldwide, resulting in production losses and costs with antibiotic use, especially when piglets from different sources are mixed [3, 4].

Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992) described 15 serovars of *Hps* by immunodiffusion method using autoclaved antigen extracts; they also classified serovars 1, 5, 10, 12, 13 and 14 as highly virulent; 2, 4, 8 and 15 as moderately virulent and 3, 6, 7, 9 and 11 as low virulent [5]. The isolation of non-typeable (NT) clinical isolates revealed a high diversity among *Hps* isolates [6], as it has been currently reported [7, 8]. In order to prevent and control GD, vaccination with commercial vaccines is largely employed; however, this practice fails to prevent GD outbreaks in some vaccinated swine herds. Most of the vaccines available in the market are bacterins formulated with one or two serovars, those most commonly isolated over the world. Their efficiency varies considerably and an unreliable cross-protection has been reported mostly [9, 4]. For these reasons, the knowledge about the *Hps* serovar circulation in a given geographic location becomes essential for a rational development and use of commercial vaccines, or even to elect the production of autogenous vaccines [10].

The countries with a major swine industry have already solved the distribution of the main *Hps* serovars and have observed that 4, 5 and 13 are located among the most prevalent [11-13] and, as it was expected, the development of vaccines has been based in these serovars. Conversely, in Brazil, which holds the fourth position among the top producer countries [14],

the distribution of the *Hps* serovars has been barely reported, making this impossible to determine their presence or not in the vaccines currently commercialized in Brazil.

The aim of this study was to ascertain the serovars of *Hps* causing GD in Brazil and their geographical distribution in order to reliably determine if they are covered or not in the vaccines commercially available, as well as to correlate serovar virulence with the sites from which *Hps* was isolated.

Materials and methods

Clinical isolates

The 460 clinical isolates of *Hps* used in this study were received in our laboratory for serotyping analysis from pigs that had clinical signs of GD (fibrinous polyserositis, arthritis, pneumonia and/or meningitis). Of the total isolates, 145 were collected between the years 2012 and 2016 and selected from the bacterial collection of our laboratory. Additionally, 102 isolates collected between the years 1987 and 2013 were came from the bacterial collection of Embrapa Swine & Poultry, and 213 isolates collected between the years 2012 and 2016 were came from the bacterial collection of the Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas Ltda (IPEVE). All the isolates were kept at -80°C until use. Data from isolate location (city and state), specimen type and sampling date were collected. The reference strains N°4, SW140, SW114, SW124, Nagasaki, 131, 174, C5, D74, H555, H465, H425, 84-17975, 84-22113, 84-15995 were used representing all the 15 known serovars, respectively [5].

DNA extraction

Bacteria were grown in chocolate agar medium supplemented with 2.5 mg/ml glucose (Sigma, Germany) and 75 µg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (Sigma) and incubated for 24-36 hours at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. A loopful of

pure culture was suspended in 200 µl of ultrapure water (Sigma), which was heated to 95°C for 10 minutes and centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 minutes, and the supernatant was transferred to another microtube. The DNA concentration and purity were measured and adequate products were used in the PCR multiplex reaction.

Typing by PCR multiplex and a modified indirect hemagglutination

The clinical isolates were firstly typed by a multiplex PCR (mPCR) designed by Howell *et al.* (2015), which was capable to differentiate 13 from the 15 known serovars [8]. Gel electrophoresis of the PCR products was performed in a 2.0% agarose gel in Tris-acetate-EDTA (TAE) at 120 volts for 90 min. The DNAs products were stained with GelRed™ (Biotium, USA) and 50-bp DNA ladder (Ludwig, Brazil) was included as the molecular size standard. The bands sizes were analyzed with the software ImageQuant TL 1D version 8.1 (GE Healthcare Life Sciences). The validation of the mPCR in our laboratory was conducted using the genomic DNA isolated from the 15 *H. parasuis* reference strains.

A modified indirect hemagglutination (mIHA) method using sheep red blood cells treated with tannic acid was used to discriminate between serovars 5 and 12 [15].

Data analyses

Data concerning all samples were firstly analyzed as descriptive statistics, where the proportional distribution and the raw count number of the identified serovars were described as a function of the year of isolation, the specimens and the locations. Furthermore, each serovar was grouped within either high or moderate virulence according to Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), and was analyzed following the same descriptive analysis describe above [5]. A chi-squared test was performed in order to verify the hypothesis of the association between the specimen and the serovars or their virulence profile.

Results

Haemophilus parasuis typing and geographical distribution of isolates

From the 460 isolates, serovars 1, 4 and NT isolates resulted in more than half of the identified isolates (57.3%), followed by serovars 14 (12.6%), 5 (10.7%), 5/12 (8.3%), 15 (4.8%) and 12 (4.6%), as shown in Fig. 1A. Serovars 2 and 13 were identified in less than 2% of isolates. Of the total of isolates, 108 were submitted to mIHA method, since the multiplex PCR was not able to differentiate between serovars 5 and 12. Forty-nine (45.4%) were classified as belonging to serovar 5; 21 (19.4%), to serovar 12, and 38 (35.2%) to serovar 5/12. Taken together these two latter serovars, as suggested by Howell *et al.* (2015) and Ma *et al.* (2016), they reached into 23.5%, thus representing the second most prevalent serovar.

Analyzing the serovars according to their virulence as proposed by Kielstein and Rapp-Gabrielson [5], 51.0% were classified as highly virulent and 31.4% as moderately virulent. An important percentage of the total isolates (17.6%) could not be typed and consequently they were not classified into these two categories (Fig 1B). The geographic distribution of the most prevalent serovars is shown in Fig. 2. The isolates came from different swine farms located in ten Brazilian states, such as Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and São Paulo (SP), thus covering four different regions of Brazil (Southern, Southeast, Midwest and Northeast), for which swine industry is economically relevant. Most of the isolates were recovered from MG (33.8%) and SC (27.6%) states. Since swine production in BA, ES, GO and MS states is insignificant and a low number of isolates were obtained from them. The serovars identified in this study were observed in almost all the states compared; MG and SC states suffered GD caused by all the serovars found in our investigation. On the other hand, the presence of the serovar 2, which

was restricted to SC and MT states, and the higher frequency of serovar 12 in RS state can be highlighted (Fig. 2).

From the 460 isolates, 444 derived from respiratory or systemic organs (Table 1), but the origin of the remaining 16 could not be ascertained. For these 444 isolates, a clear dependence between the serovar and the isolation site was found after using the chi-square test ($p < 0.001$) (Table 1). Almost all serovars were mostly isolated from the lungs, as serovar 1 (72.7%), serovar 4 (81.7%) and serovar 12 (95.2%). NT *H. parasuis* were isolated from different respiratory sites, as lungs (64.9%), nasal cavity (13.0%) and trachea (10.4%) and almost none from systemic locations. However, serovars 4, 5 and 14 were mainly isolated from systemic sites (brain, heart, articulations and cavity liquids).

When the serovars were grouped according to their virulence a dependence with the isolation site was also found ($p = 0.006$) (Table 2). Overall, 80.8% of the *H. parasuis* isolates were recovered from respiratory sites and 19.2% from systemic sites. The moderately virulent and the NT *H. parasuis* had a similar distribution among the systemic and respiratory locations (Table 2); however, 62.5% of the highly virulent isolates were obtained from systemic organs, while 48.2% were from respiratory organs.

The temporal distribution over 22 years of the four most prevalent *H. parasuis* serovars is shown in Figs. 3 to 5. A considerably higher number of isolates were obtained from 2013 until 2016. The distribution of the most prevalent serovars (1, 4, 14 and NT) appears in Fig. 3, being serovar 4 the most commonly identified, followed by NT *H. parasuis*, and those belonging to serovars 1 and 14. This latter serovar showed a continuous increase from 2013, while serovars 4, 14 and NT isolates fell from 2015 (Fig. 3). The number of the serovars with lower prevalences is seen in Fig. 4, in which a sharp increase of serovar 5/12 in 2014, as well as a growing trend for serovar 5 must be highlighted. When the serovars were

grouped by their virulence, a sudden rise of the highly virulent isolates was observed from 2013 onwards in comparison with the low virulent and NT *H. parasuis* isolates (Fig. 5).

Discussion

In order to effectively prevent and control GD it is essential to know the serovar occurrence and distribution in a given country. The commercially available vaccines in Brazil are composed exclusively of the serovar 5 or alternatively of the mixture of serovars 1 and 6. The choice to apply these specific serovars is based in the results yielded by epidemiological studies in other countries. The aim of the present was to determine the *H. parasuis* serovars associated to GD in ten Brazilian states, as well as their geographical distribution. A total of 10 serovars and a considerable amount of NT isolates were identified, thus showing the high diversity of *H. parasuis* isolates spread in Brazil. While serovars 4, 5 and 13 become the most prevalent in other countries [13, 16, 17], serovars 1 and 4, along with NT isolates comprehend more than half of the total typed isolates in Brazil. Previous studies performed in our country also reported serovar 4 as the most prevalent, but followed by the serovars 5, 14 and 13 [18-20].

Meanwhile, this is the first investigation carried out with Brazilian *H. parasuis* isolates using a PCR multiplex assay as typing method [8]. Previous reports used immunodiffusion or a modified indirect hemagglutination which had already showed a lot of design flaws in their performance, especially in the development of hyperimmune sera against all serovars, in the occurrence of cross-reactions and in the appearance of a high number of NT isolates. Furthermore, these earlier studies evaluated only around 50 *H. parasuis* isolates without taking into consideration the most important states related to swine production in Brazil [18-20, 15].

Howell *et al.* (2015) did not find any NT isolate in their investigation; however, a rate of 17.6% of NT isolates was found by us using the same protocol [8]. Other studies found 24% and 60.3% of NT isolates using immunodiffusion and indirect hemagglutination methods [18, 15]. The true involvement of NT *H. parasuis* in GD has not been well determined; however, these isolates which are incapable to be typed reflect the high genetic variability existing among the serovars described so far, becoming of interest for later studies given its high prevalence [5].

The PCR multiplex developed by Howell *et al.* (2015) does not allow differentiating between serovars 5 and 12; for this reason, the modified IHA by Lorenson *et al.* (2017) was used by us in the 108 isolates whose typing result was serovar 5 or 12, reducing this number to 38 [8, 15]. The high number of isolates typed as 5 or 12 and NT reinforce the need of standardization of new methods for *H. parasuis* typing. Other alternative suggested by Howell *et al.* (2015) and Ma *et al.* (2016) is grouping together serovars 5 and 12, based on the cross-protection proved in the pigs vaccinated with serovar 5 and then challenge with serovar 12 [9, 8]. Keeping in mind this approach, the prevalence of this serovar 5/12 would achieve the second higher occurrence (23.6%) in our study. This fact shows the possibility of this serovar being the same one or only a variation in isolates from the same serovar.

We were able to analyze the geographical distribution of serovars and a wide diversity of them in the states of MG and SC, where the swine industry is relevant in Brazil, could be observed. In addition, some serovars were confined to some states, like serovar 2 in SC and MT, while some serovars were more present in a given state, like serovar 12 in RS. However, despite of the state, the outbreaks of GD in Brazil seem to be caused in general by the same diverse number of serovars. This find is in line with the lack of cross-protection observed and with the increasing mortality rates reported in Brazil.

A percentage of 51.0% of the isolates were classified as highly virulent and 31.4% as moderately virulent in this study. Of them, 62.5% of the highly virulent *H. parasuis* had been isolated from systemic sites, against 48.2% being recovered from respiratory tissues. These findings reinforce the virulence classification reported by Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), in which the inoculation of specific pathogen free pigs with serovars 1, 5, 10, 12, 13 or 14 resulted in death quickly, whilst the inoculation with serovars 2, 4 or 15 caused polyserositis without death; that with serovar 8 originated mild signs of GD, and finally the pigs inoculated with serovars 3, 6, 7, 9 or 11 resulted in no clinical signs [5].

All the serovars were analyzed over a 22 year period, and a increase in the number of *H. parasuis* isolated from GD from 2013 up to 2016 was verified. This observation might be due to the greater number of outbreaks or to the greater amount of samples being sent to diagnosis. When serovars were grouped by their virulence, a rise of the highly virulent compared to moderately virulent and NT isolates was seen. We suspect that one of the reasons for the highest number of outbreaks after 2013 is related to the emergence of other pathogens, since *H. parasuis* has been often regarded as an opportunistic secondary pathogen, causing disease in association with other viral or bacterial agents [4]. In this way, the increase of *H. parasuis* associated with the growing prevalence of *Mycoplasma pneumoniae*, or with viral respiratory pathogens, such as swine influenza virus, has been reported [21]. Since 2009 onwards, the Brazilian swine industry has suffered outbreaks of Influenza A (pH1N1) being associated with respiratory disease. These outbreaks occurred primarily in the major swine production regions, as Southern, Midwestern and Southeastern Brazil [22].

In order to develop autogenous vaccines it is necessary to collect samples from systemic sites of *H. parasuis* infection, like meninges, pericardium and articulations [23, 24] to obtain the serovar that is causing a GD outbreak. However, the tissues mostly sent to diagnosis laboratory were those arising from respiratory tract, thus explaining the high

number of lung (72.0%), trachea (8.2%) or nasal cavity (3.6%) isolates. Serovars 1 and 4 and NT isolates were those mainly isolated from respiratory sites, with rates of 86.7%, 87.2% and 88.3%, respectively. Conversely, serovars 5 and 14 were recovered from 66% and 72.7%, respectively. Oliveira *et al.* (2003) found that serovars 1, 4, 12, 14 and NT *H. parasuis* were recovered from both respiratory and systemic sites, while serovars 2, 5 and 13 were only from systemic locations [13]. Macedo *et al.* (2011) isolated the majority of Brazilian *Hps* serovars from the respiratory tract, except for serovar 5, which was obtained from systemic sites [18]. Here, mostly serovars were seen in both respiratory and systemic origins, but serovar 12 was found exclusively in respiratory sites. Although 88.3% of NT isolates were recovered from respiratory sites by us, previous authors have reported NT *H. parasuis* mainly related to systemic sites [10, 17, 18].

The comparison of the isolates obtained from the respiratory tract of swine without polyserositis revealed an increased frequency of serovar 4, whereas the frequency of isolation of serovars 5, 12 14 and NT isolates from animals with or without polyserositis were similar. Rapp-Gabrielson and Gabrielson (1992) also evaluated the relation between serovars and isolation site and found serovars 4 and 5 being frequently isolated from swine with polyserositis, while serovar 2 was mainly isolated from pigs without it [25]. However, Luppi *et al.* (2013) demonstrated that the frequency of serovar 4 was higher in swine with polyserositis than in those affect only with pneumonia [26]. Serovar 5 was reported with similar frequency in both systemic and respiratory clinical signs of GD. In our study, the only information about the isolates which were received in the laboratory was their isolation site, without data regarding if the pigs suffered polyserositis or not.

Cross-protection among different serovars or even among *H. parasuis* from the same serovar is broadly variable and hard to predict, having been reported as sporadic and inconsistent [9, 4]. Rapp-Gabrielson *et al.* (1997) immunized pigs with serovar 4 and

evaluated cross-protection against serovars 2, 4, 5, 12, 13 and 14, founding only protection against homologous challenge and serovar 5; curiously enough, the immunization with serovar 5 induced protection only against the challenge with itself. In the same study, using a bivalent bacterin (composed by serovars 4 and 5), the authors observed a reduced severity of the lesions and mortality of swine challenged with serovars 13 and 14; however, none protection against serovars 2, 12 and NT isolates was observed. Takahashi *et al.* (2001) conducted a similar study and found lack of cross-protection between serovars 2 and 5 [27]. Other study evaluated the protective immunity induced in swine vaccinated with serovar 5, demonstrating effective protection only against the homologous serovar and partial protection (clinical signs but without mortality) against the serovars 1, 12, 12 and 14 [9].

Based on our findings, we prove that the commercially available vaccines in Brazil do not include the most prevalent serovars isolated from clinical samples from GD. In order to work around this problem, the use of autogenous vaccines, especially in the Brazilian states for which the serovars identified here are not included in the vaccines composition, is suggested. The importance of this study for a rational control of GD and discussion about the serovars that should be included in the vaccines commercialized in Brazil is highlighted. Because GD is highly prevalent in Brazil and is responsible for big economic losses, there is a strong need to make efforts in terms of overcoming this problem.

Conclusion

The most prevalent serovars found among *H. parasuis* Brazilian isolates are not included in the composition of the commercially available vaccines. There is a high diversity of serovars as well as NT isolates in all the Brazilian states here represented, which might explain the lack of protection induced by these vaccines.

References

1. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J Med Microbiol*. 1969;2(1):75-8. doi: 10.1099/00222615-2-1-75.
2. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Invest*. 2001;13(6):495-501.
3. Møller K, Andersen LV, Christensen G, Kilian M. Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Veterinary microbiology*. 1993;36(3-4):261-71.
4. NEDBALCOVA K, SATRAN P, ZJAGLIC, ONDRIASOVA R, KUCEROVA Z. *Haemophilus parasuis* and Glasser's disease in pigs: a review. *Veterinarni Medicina*. 2006;51(5).
5. Kielstein P, Rapp-Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J Clin Microbiol*. 1992;30(4):862-5.
6. Rafiee M, Bara M, Stephens CP, Blackall PJ. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J*. 2000;78(12):846-9.
7. Lin BC. Identification and differentiation of *Haemophilus parasuis* sero-nontypeable strains using a species-specific PCR and the digestion of PCR products with Hind III endonuclease. *Analele Universității Spiru Haret*. 2010:103.
8. Howell KJ, Peters SE, Wang J, Hernandez-Garcia J, Weinert LA, Luan SL, et al. Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3812-21. doi: 10.1128/JCM.01991-15.
9. Bak H, Riising HJ. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet Rec*. 2002;151(17):502-5.
10. Angen O, Svensmark B, Mittal KR. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet Microbiol*. 2004;103(3-4):255-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.07.013.
11. Blackall PJ, Rapp-Gabrielson VJ, Hampson DJ. Serological characterisation of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. *Aust Vet J*. 1996;73(3):93-5.
12. M. L. DR, Gutiérrez CB, Ferri EFR. Value of Indirect Hemagglutination and Coagglutination Tests for Serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(2). Epub 882.
13. Oliveira S, Blackall PJ, Pijoan C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. *Am J Vet Res*. 2003;64(4):435-42.
14. Animal A-ABdP. Relatório Anual 2016. 2016.
15. Lorenson MS, Miani M, Guizzo JA, Barasuol B, Martínez-Martínez S, Ferri EFR, et al. Altered indirect hemagglutination method for easy serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2016.
16. 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. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):839-40.
17. Cai X, Chen H, Blackall PJ, Yin Z, Wang L, Liu Z, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Vet Microbiol*. 2005;111(3-4):231-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.07.007.
18. Macedo NR, Oliveira SR, Lage AP, Santos JL, Araujo MR, Guedes RM. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. *Vet J*. 2011;188(3):362-4. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.05.024.

19. Moreno LZ, Castilla KS, de Gobbi DD, Coutinho TA, Ferreira TS, Moreno AM. ERIC-PCR genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine. *Braz J Microbiol.* 2011;42(4):1420-6. doi: 10.1590/S1517-838220110004000025.
20. 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. *Res Vet Sci.* 2012;92(3):366-71. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.04.006.
21. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of Swine*: Wiley; 2006.
22. Nelson MI, Schaefer R, Gava D, Cantao ME, Ciacci-Zanella JR. Influenza A Viruses of Human Origin in Swine, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(8):1339-47. doi: 10.3201/eid2108.141891.
23. Smart NL, Miniats OP, MacInnes JI. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Can J Vet Res.* 1988;52(3):319-24.
24. Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol.* 2004;99(1):1-12. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.12.001.
25. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am J Vet Res.* 1992;53(5):659-64.
26. Luppi A, Bonilauri P, Dottori M, Iodice G, Gherpelli Y, Merialdi G, et al. *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(2):140-2. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01326.x.
27. Takahashi K, Naga S, Yagihashi T, Ikehata T, Nakano Y, Senna K, et al. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *J Vet Med Sci.* 2001;63(5):487-91.

Table 1. Anatomical sites and classification of *H. parasuis* isolated from pigs with Glässer's Disease.

Typing was performed by mPCR and mIHA.

Anatomical site												Total (%)
	NT	1	2	4	5	5/12	12	13	14	15		
Abdominal liquid				1					2			3 (0.65%)
Articulations		1		2					3			6 (1.3%)
Brain	5	1		1	4	1			4			17 (3.7%)
Heart	3	5	2	11	9	2		1	4	1		38 (8.27%)
Lung	50	40	3	98	31	27	20	2	35	13		319 (69.49%)
Nasal	10					1			1	4		16 (3.48%)
Peritoneum	1											1 (0.21%)
Spleen					1							1 (0.21%)
Thoracic liquid				1	2	1			2	1		7 (1.52%)
Trachea	8	8		6		6	1		4	3		36 (3.48%)
Not determined	4	5		2	2				3			16 (3.48%)
Total	81	60	5	122	49	38	21	3	58	22		459 (100 %)

NT, non-typeable isolates

Table 2. Occurrence of *H. parasuis* serovar isolation according to virulence and site of isolation within pigs affected with Glässer's Disease.

Source	Serovar classification		Total	
	Highly virulent	Moderately virulent	NT	
Respiratory system	184 (40.08%)	126 (27.45%)	68 (14.82%)	378 (82.35%)
Systemic	50 (10.88%)	18 (3.92%)	13 (2.83%)	81 (17.64%)
Total	234 (50.98 %)	144 (31.37 %)	81 (17.64 %)	459 (100.0 %)

NT – non-typeable serovar

Figure 1

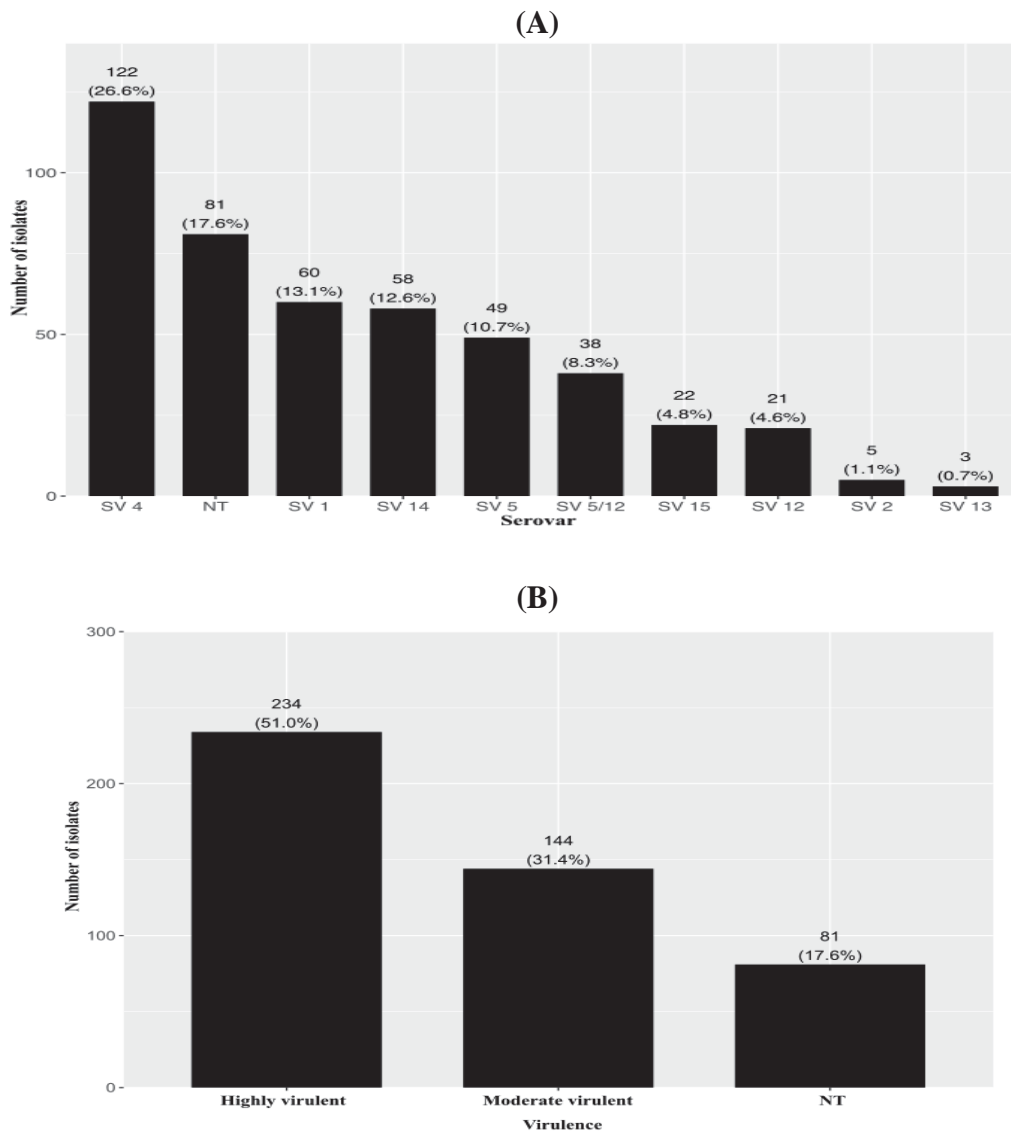


Figure 1. Prevalence of *H. parasuis* serovars identified by means of PCR multiplex and a modified indirect hemagglutination when necessary. **(A)** Rate of the different serovars, **(B)** Rate of the different serovars grouped according to their virulence, as proposed by Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992). NT, non-typeable isolates.

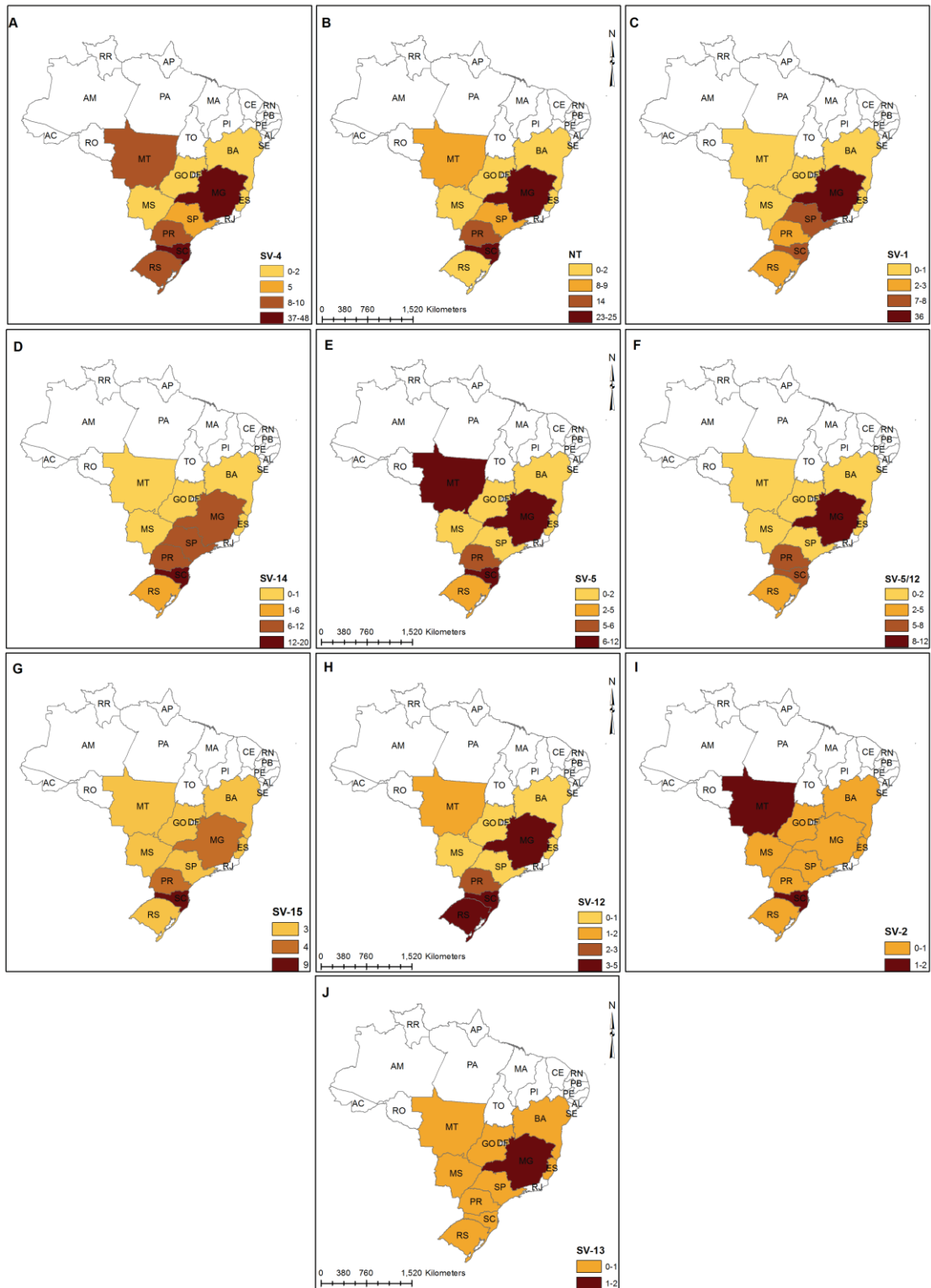


Figure 2. Geographic distribution of the most prevalent *Haemophilus parasuis* serovars for each of the ten states. (A) serovar 4, (B), non-typeable *H. parasuis*, (C) serovar 1, (D) serovar 14, (E) serovar 5, (F) serovar 5/12, (G) serovar 15, (H) serovar 12, (I) serovar 2, (J) serovar 13.

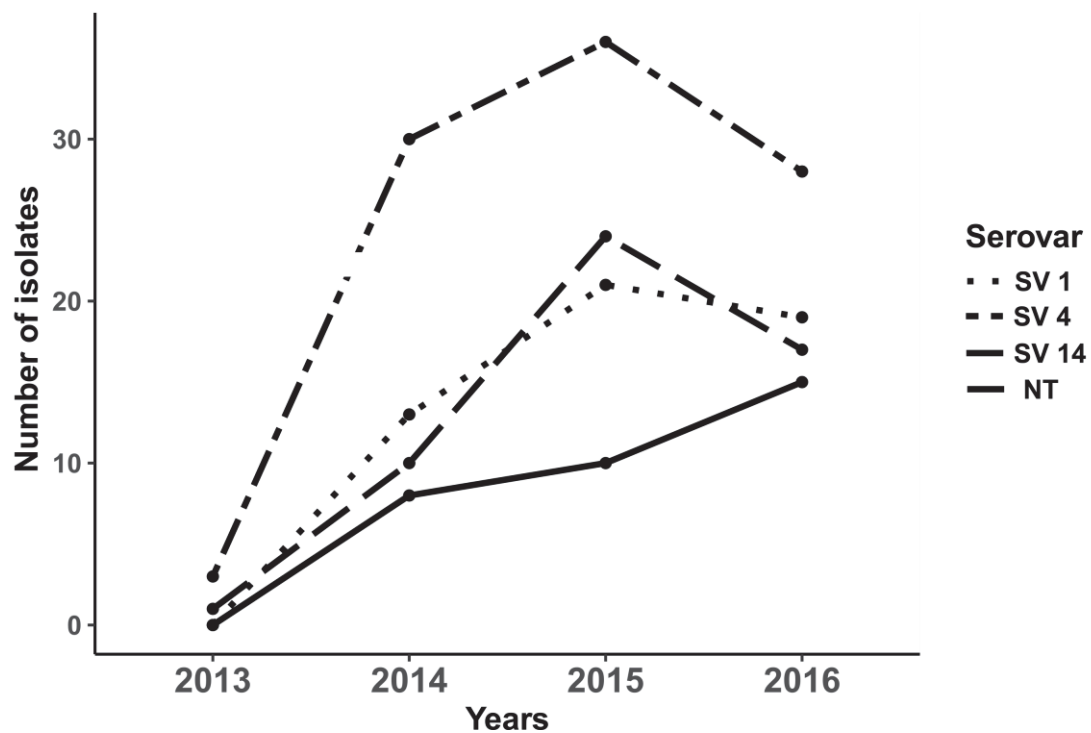


Figure 3. Distribution over the years of *Haemophilus parasuis* isolates for the most prevalent serovars which represent 69.9% of them. NT, non-typeable isolates.

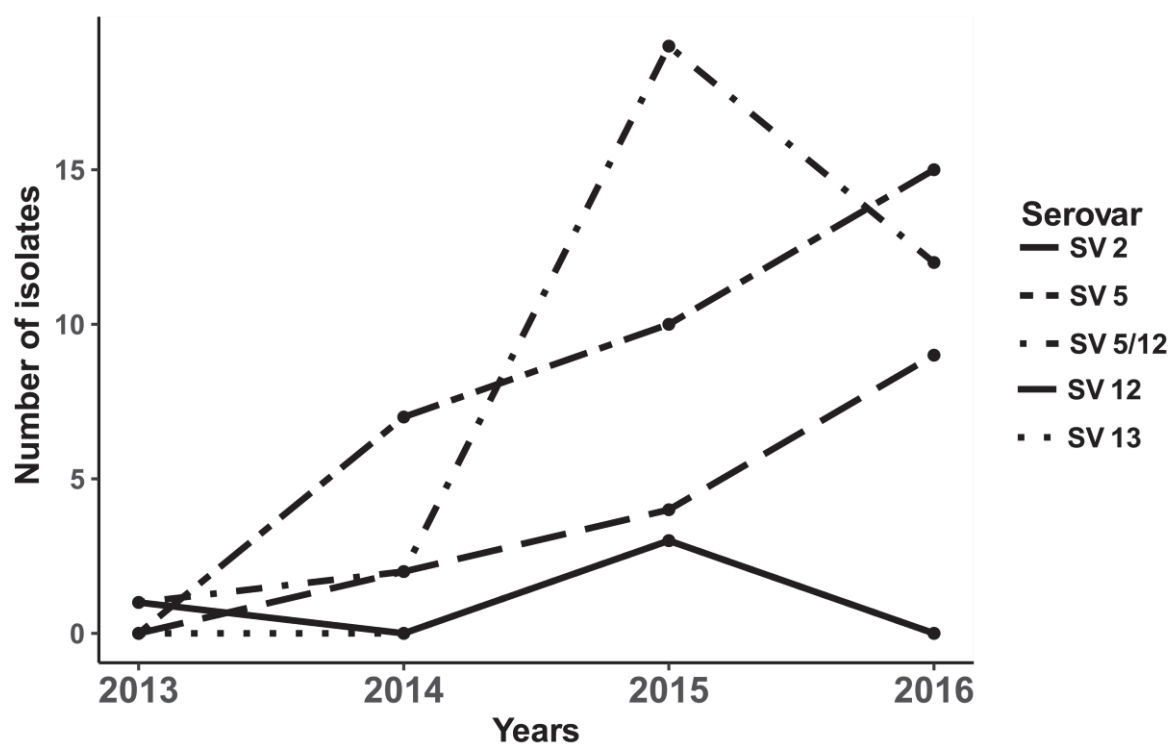


Figure 4. Distribution over the years of *Haemophilus parasuis* isolates for the less prevalent serovars.

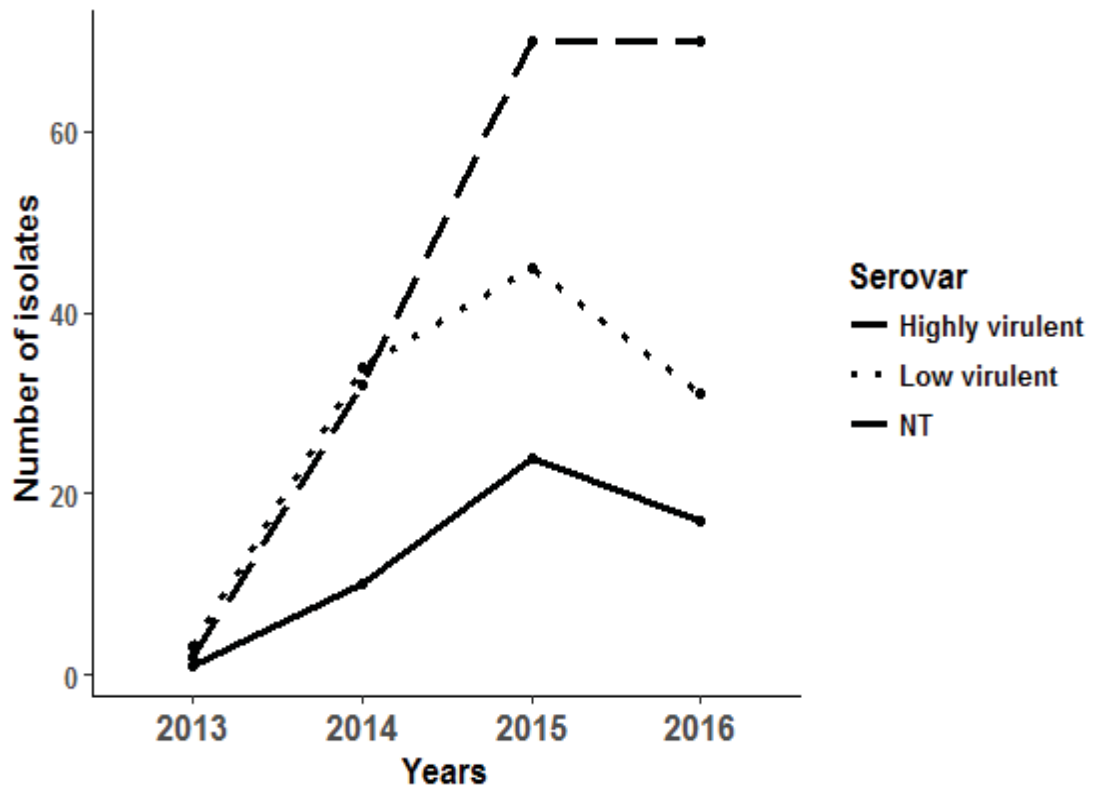


Figure 5. Distribution over the years of *Haemophilus parasuis* isolates with regard to virulence, according to Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992). NT, non-typeable isolates.

4. CONCLUSÕES

Infecções produzidas por *H. parasuis* representam, atualmente, um dos grandes problemas preventivos para a suinocultura mundial. Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- a) Surto de Doença de Glässer no Brasil estão associados às infecções produzidas cepas de *H. parasuis* pertencentes aos sorovares 4, 1, 14, 5 e cepas não tipificáveis;
- b) Os sorovares mais prevalentes no Brasil são o sorovar 4, NS, SV 1, e SV 14, representando mais de 69% das amostras analisadas;
- c) Todos os sorovares estão distribuídos de forma homogênea nos diferentes estados produtores de suínos, sugerindo a circulação de cepas de um mesmo sorovar;
- d) A técnica de PCR multiplex combinada com a HIm permitiu a tipificação de 82.4 % das cepas analisadas, convertendo a combinação destas técnicas em ideais para a rotina de tipificação de *H. parasuis*, bem como, para o desenvolvimento estudos epidemiológicos;
- e) Os sorovares mais prevalentes encontrados no Brasil não estão incluídos na composição das principais vacinas comerciais;
- f) Todas as cepas tipificadas pertencem ao grupo de sorovares altamente e moderadamente virulentos, capazes de desencadear a Doença de Glässer;
- g) Temporalmente, o número de isolamentos de *H. parasuis* aumentou a partir do ano de 2013 no país e, entre os sorovares, o SV 4 foi o mais prevalente;

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, a Doença de Glässer (DG), causada pelo *H. parasuis*, vem se destacando como uma das principais doenças emergentes dos rebanhos suínos, responsável por produzir significativas perdas econômicas em razão dos altos índices de mortalidade e em decorrência dos gastos com antimicrobianos. A imunoprevenção dessa doença é baseada em bacterinas inativadas cuja eficiência heteróloga é ausente ou escassa, dificultando o controle da DG.

Neste trabalho, apresentamos de forma inédita, a distribuição dos diferentes sorovares de *H. parasuis* envolvidos nos surtos de DG em nível nacional e, destacamos que as vacinas comerciais disponíveis no Brasil não incluem 76.3% dos sorovares presentes em nossas granjas produtoras de suínos. Desta maneira, o sucesso da prevenção da DG em curto prazo está condicionado ao uso de vacinas autógenas e, em longo prazo, a uma atualização da composição antigênica das atuais vacinas comerciais.

Em relação às estratégias preventivas, destacamos a importância do Médico Veterinário de solicitar o isolamento e a tipificação do agente envolvido em um surto de Doença Glässer, preconizando sempre o envio de amostras sistêmicas, as quais permitirão identificar o patógeno implicado no surto.

No laboratório, a tipificação molecular através da PCR multiplex combinada com a HIM mostraram-se altamente eficientes para tipificar cepas clínicas de *H. parasuis*. A identificação do sorovar da cepa clínica auxilia o profissional a tomar uma decisão com relação à vacina que será utilizada na granja com DG, a qual deverá conter em sua formulação o mesmo sorovar presente na granja. Se isso não for possível, o Médico Veterinário poderá então solicitar o desenvolvimento de uma vacina autógena.

O sucesso das vacinas autógenas dependerá da escolha da cepa que está causando a DG e, neste sentido, o isolamento de clones bacterianos de maior virulência, os quais encontram-se em sítios sistêmicos distantes do ambiente pulmonar, devem ser priorizados. Esta orientação parece não estar sendo seguida em nosso contexto nacional, já que as vacinas autógenas atualmente comercializadas no Brasil são formuladas com cepas isoladas quase que exclusivamente de pulmões.

Em síntese nossos resultados revelam um cenário preocupante em relação à prevenção vacinal das infecções produzidas pelo *H. parasuis* no Brasil e, ao mesmo tempo, abrem diversas frentes científicas que nos permitirão entender melhor os aspectos epidemiológicos básicos da infecção, possibilitando delinear estratégias imunopreventivas baseadas em vacinas clássicas.

6. REFERÊNCIAS

1. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J Med Microbiol.* 1969;2(1):75-8.
2. Hoefling DC. The various forms of *Haemophilus parasuis*. *Swine health and production: the official journal of the American Association of Swine Practitioners (USA).* 1994.
3. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of Swine: Wiley;* 2006.
4. NEDBALCOVA K, SATRAN P, Z.JAGLIC, ONDRIASOVA R, KUCEROVA Z. *Haemophilus parasuis* and Glasser's disease in pigs: a review. *Veterinarni Medicina.* 2006;51(5).
5. Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol.* 2004;99(1):1-12.
6. 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.
7. Turni C, Blackall PJ. Serovar profiling of *Haemophilus parasuis* on Australian farms by sampling live pigs. *Aust Vet J.* 2010;88(7):255-9.
8. Howell KJ, Peters SE, Wang J, Hernandez-Garcia J, Weinert LA, Luan SL, et al. Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol.* 2015;53(12):3812-21.
9. Cai X, Chen H, Blackall PJ, Yin Z, Wang L, Liu Z, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Vet Microbiol.* 2005;111(3-4):231-6.
10. Angen O, Svensmark B, Mittal KR. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet Microbiol.* 2004;103(3-4):255-8.
11. Dijkman R, Wellenberg GJ, van der Heijden HM, Peerboom R, Olvera A, Rothkamp A, et al. Analyses of Dutch *Haemophilus parasuis* isolates by serotyping, genotyping by ERIC-PCR and Hsp60 sequences and the presence of the virulence associated trimeric autotransporters marker. *Res Vet Sci.* 2012;93(2):589-95.
12. M. L. DR, Gutiérrez CB, Ferri EFR. Value of Indirect Hemagglutination and Coagglutination Tests for Serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(2).
13. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am J Vet Res.* 1992;53(5):659-64.
14. Animal A-ABdP. Relatório Anual 2016. 2016.
15. 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. *Res Vet Sci.* 2012;92(3):366-71.
16. dos Santos JL. Epidemiologia e controle da infecção por *Haemophilus parasuis*. 1997.
17. Macedo NR, Oliveira SR, Lage AP, Santos JL, Araujo MR, Guedes RM. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. *Vet J.* 2011;188(3):362-4.
18. Moreno LZ, Castilla KS, de Gobbi DD, Coutinho TA, Ferreira TS, Moreno AM. ERIC-PCR genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine. *Braz J Microbiol.* 2011;42(4):1420-6.
19. Lorenson MS, Miani M, Guizzo JA, Barasuol B, Martínez-Martínez S, Ferri EFR, et al. Altered indirect hemagglutination method for easy serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2017.

20. 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.
21. Frandoloso R, Martinez-Martinez S, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Ferri EF. *Haemophilus parasuis* serovar 5 Nagasaki strain adheres and invades PK-15 cells. *Veterinary microbiology*. 2012;154(3-4):347-52.
22. Nicolet J. *Haemophilus parasuis*. *Diseases of swine*. 1992;7:526-8.
23. Gu W, Chen SW, Chen GP, Ji ZX. Enhancement of *Haemophilus parasuis* serovar 5 yields by medium optimization. *Lett Appl Microbiol*. 2015;61(1):44-9.
24. Segales J, Domingo M, Solano GI, Pijoan C. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *J Vet Diagn Invest*. 1997;9(3):237-43.
25. 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. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1991;38(4):315-20.
26. Quinn PJ, Quinn PJ. *Clinical Veterinary Microbiology: Wolfe*; 1994.
27. Miani M, Lorenson MS, Guizzo JA, Espíndola J, Rodríguez-Ferri EF, Gutiérrez-Martín CB, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of Brazilian *Haemophilus parasuis* field isolates. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017.
28. Morozumi T, Nicolet J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *J Clin Microbiol*. 1986;23(6):1022-5.
29. Bakos K. Studien über *Haemophilus suis*. mit besonderer Berücksichtigung der serologischen Differenzierung seiner Stämme. DVM dissertation. University of Stockholm, Stockholm, Sweden. (In German.); 1955.
30. 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. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):839-40.
31. Oliveira S, Blackall PJ, Pijoan C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. *Am J Vet Res*. 2003;64(4):435-42.
32. Smart NL, Miniats OP, MacInnes JI. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Can J Vet Res*. 1988;52(3):319-24.
33. Blackall PJ, Trott DJ, Rapp-Gabrielson V, Hampson DJ. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Vet Microbiol*. 1997;56(1-2):125-34.
34. Rafiee M, Bara M, Stephens CP, Blackall PJ. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J*. 2000;78(12):846-9.
35. de la Puente Redondo VA, Navas Mendez J, Garcia del Blanco N, Ladron Boronat N, Gutierrez Martin CB, Rodriguez Ferri EF. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. *Veterinary microbiology*. 2003;92(3):253-62.
36. Rubies X, Kielstein P, Costa L, Riera P, Artigas C, Espuna E. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet Microbiol*. 1999;66(3):245-8.
37. Zhang J, Xu C, Guo L, Shen H, Deng X, Ke C, et al. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2012;76(3):224-9.
38. Blackall PJ, Rapp-Gabrielson VJ, Hampson DJ. Serological characterisation of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. *Aust Vet J*. 1996;73(3):93-5.

39. Luppi A, Bonilauri P, Dottori M, Iodice G, Gherpelli Y, Merialdi G, et al. *Haemophilus parasuis* serovars isolated from pathological samples in Northern Italy. *Transbound Emerg Dis*. 2013;60(2):140-2.
40. Møller K, Andersen LV, Christensen G, Kilian M. Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Veterinary microbiology*. 1993;36(3-4):261-71.
41. Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *J Vet Diagn Invest*. 1995;7(4):476-80.
42. Vahle JL, Haynes JS, Andrews JJ. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Can J Vet Res*. 1997;61(3):200-6.
43. 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. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(1):50-8.
44. Sobestiansky J. *Doenças dos suínos: Cânone Editorial*; 2007.
45. Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J Vet Med Sci*. 1994;56(4):639-44.
46. Solano-Aguilar GI, Pijoan C, Rapp-Gabrielson V, Collins J, Carvalho LF, Winkelman N. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. *Am J Vet Res*. 1999;60(1):81-7.
47. Nielsen R. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. *Acta Vet Scand*. 1993;34(2):193-8.
48. Takahashi K, Naga S, Yagihashi T, Ikehata T, Nakano Y, Senna K, et al. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *J Vet Med Sci*. 2001;63(5):487-91.
49. Macedo N, Oliveira S, Torremorell M, Rovira A. Immune response to oligopeptide permease A (OppA) protein in pigs naturally and experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Res Vet Sci*. 2016;107:62-7.
50. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Invest*. 2001;13(6):495-501.
51. Angen O, Oliveira S, Ahrens P, Svensmark B, Leser TD. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol*. 2007;119(2-4):266-76.
52. Frandoloso R, Martinez-Martinez S, Rodriguez-Ferri EF, Gutierrez-Martin CB. Comparison of real-time PCR and culture isolation in colostrum-deprived pigs immunized and challenged with *Haemophilus parasuis*. *Letters in applied microbiology*. 2012;54(2):149-52.
53. Turni C, Pyke M, Blackall PJ. Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*. *J Appl Microbiol*. 2010;108(4):1323-31.
54. 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.
55. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Angen O. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet Microbiol*. 2004;101(2):143-6.

56. Dayao DA, Kienzle M, Gibson JS, Blackall PJ, Turni C. Use of a proposed antimicrobial susceptibility testing method for *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol.* 2014;172(3-4):586-9.
57. Bak H, Riising HJ. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet Rec.* 2002;151(17):502-5.
58. Xue Q, Zhao Z, Liu H, Chen K, Xue Y, Wang L. First comparison of adjuvant for trivalent inactivated *Haemophilus parasuis* serovars 4, 5 and 12 vaccines against Glasser's disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;168(3-4):153-8.
59. Hu M, Zhang Y, Xie F, Li G, Li J, Si W, et al. Protection of piglets by a *Haemophilus parasuis* ghost vaccine against homologous challenge. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(6):795-802.
60. Fu S, Ou J, Zhang M, Xu J, Liu H, Liu J, et al. The live attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* triple-deletion mutant DeltaapxIC DeltaapxIIC DeltaapxIV-ORF1 strain, SLW05, Immunizes pigs against lethal challenge with *Haemophilus parasuis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(2):134-9.
61. Fu S, Zhang M, Ou J, Liu H, Tan C, Liu J, et al. Construction and immune effect of *Haemophilus parasuis* DNA vaccine encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mice. *Vaccine.* 2012;30(48):6839-44.
62. Lin BC. Identification and differentiation of *Haemophilus parasuis* sero-nontypeable strains using a species-specific PCR and the digestion of PCR products with Hind III endonuclease. *Analele Universității Spiru Haret.* 2010:103.
63. Docic M, Bilkei G. Das Vorkommen von *Haemophilus parasuis* Serotypen in der Stall-und Freilandhaltung im Länderdreieck Ungarn/Rumänien/Serbien. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serotypes in large outdoor and indoor pig units in Hungary/Romania/Serbia. 2004.
64. Nelson MI, Schaefer R, Gava D, Cantao ME, Ciacci-Zanella JR. Influenza A Viruses of Human Origin in Swine, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(8):1339-47.