



Doença de Glässer: Uma revisão [Glässer's Disease: A review]

"Revisão/Review"

Guilherme Arruda Cezar¹, Clara Nilce Barbosa^{1*}, Nelson Morés²

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

²Laboratório de Sanidade e Genética Animal, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: claranbarbosa@yahoo.com

Resumo

Haemophilus parasuis é o agente etiológico da doença de Glässer e causa graves prejuízos econômicos na indústria suína. O diagnóstico da doença é baseado na associação do histórico clínico do rebanho, isolamento da bactéria e sorotipagem. O difícil controle do agente e das co-infecções tornam-se imprescindível o uso de tratamentos estratégicos e programas vacinais, conjugados com boas práticas de manejo. Esta revisão apresenta uma abordagem geral da Doença de Glässer e discute os aspectos epidemiológicos, diagnóstico, imunidade, prevenção e controle.

Palavras-chave: *Haemophilus parasuis*; bactéria; diagnóstico; epidemiologia; suíno.

Abstract

Haemophilus parasuis is the etiological agent of Glässer's disease, and causes severe economic losses in the swine industry. Its diagnosis is based on the herd's clinical history, isolation of the bacterium and serotyping. The difficult control of the agent and co-infections require strategic treatments and vaccination programs associated with good management practices. This review presents a general approach to Glässer's disease and discusses epidemiological aspects, diagnosis, immunity, prevention and control.

Keywords: *Haemophilus parasuis*; bacterium; diagnosis; epidemiology; swine.

Introdução

Com a intensificação da produção de suínos, os problemas sanitários têm sido uma preocupação constante para os técnicos e produtores, principalmente, referentes às enfermidades respiratórias, entre elas a Doença de Glässer (DG). A doença foi descrita pela primeira vez por K. Glässer (1910) na Alemanha, citado por Nielsen e Danielsen (1975). Após vários estudos, Biberstein e White isolaram e identificaram o *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) em 1969.

H. parasuis é um microrganismo que pode ser encontrado na cavidade nasal de suínos saudáveis e também é o agente etiológico da DG que se caracteriza por poliserosite fibrinosa, poliartrite e meningite em suínos (Little, 1970). A ocorrência e a severidade da doença podem estar relacionadas ao estado imunitário dos animais. Em

rebanhos com imunidade específica ou previamente exposto ao agente, a doença acomete suínos de 4 a 8 semanas (Nielsen e Danielsen 1975; Macedo et al., 2009). O diagnóstico conclusivo é baseado no histórico clínico do rebanho ao isolamento do agente, presente nas lesões características, e a sorotipagem (Rapp-Gabrielson et al. 1992; Aragon et al., 2012).

O impacto econômico da DG na produção de suínos, reflete na redução dos índices zootécnicos e aumento dos custos atribuídos ao seu controle e das co-infecções de origem viral e ou bacteriana (Liu et al., 2017). Sendo assim, esta revisão tem como objetivo fazer uma abordagem geral da DG e discutir os aspectos epidemiológicos, diagnóstico, imunidade e controle.

Etiologia

H. parasuis é uma bactéria gram negativa, imóvel, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) dependente e membro da família Pasteurallaceae. No entanto, a classificação do gene 16S RNAr mostrou que o *Haemophilus*, o *Actinobacillus* e a *Pasteurella*, não formam um grupo monofilético dentro da Pasteurallaceae (Angen et al., 2007).

As cepas de *H. parasuis* são distintas em aspectos fenotípicos, genotípicos e virulência, sendo essencial a classificação para o diagnóstico e controle do *H. parasuis*. Aragon et al., 2012 descreveram que a diferenciação das cepas do *H. parasuis* em patogênicas e não patogênicas é imprescindível quando se visa estratégias vacinais no rebanho. Os primeiros estudos para classificação foram baseados nas propriedades antigênicas definidas pelo teste de imunodifusão em gel de Agar (AGID) usando antígenos solúveis termoestáveis e anticorpos policlonais de coelho (Morozumi e Nicolet, 1986; Rapp-Gabrielson e Gabrielson, 1992). Os isolados que compartilharam antígenos similares foram classificados em 15 sorovares (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992).

A alta porcentagem de cepas isoladas não tipificáveis (NT), identificadas através da AGID, levaram ao desenvolvimento de um método de sorotipificação através da hemaglutinação indireta, o qual é mais eficiente na classificação do *H. parasuis* dentro dos 15 grupos de sorovares já reconhecidos (Del Río et al., 2003a; Tadjine et al., 2004). Entretanto, com essa técnica, a redução no número de isolados NT não foi satisfatória e ocorreram várias discrepâncias. Esses resultados contraditórios foram, provavelmente, devido aos diferentes métodos de diagnósticos, tipos de anticorpos e reações inespecíficas. O alto percentual de cepas NT entre os 15 sorogrupos conhecidos sinaliza para a existência de outros sorogrupos ainda não identificados (Turni e Blackall, 2005).

Os sorovares 4, 5 e NT são os mais prevalentes na maioria dos países (Rapp-Gabrielson e Gabrielson, 1992; Del Río et al., 2003b; Oliveira et al., 2003; Tadjine et al., 2004; Cai et al., 2005; Turni e Blackall, 2005; Lin et al., 2018; Zhao et al., 2018). Os estudos de Castilla et al. (2012) realizados em vários Estados Brasileiros

mostraram alta prevalência para os sorovares 2, 4, 5, 13, 14 e NT.

Na literatura não há registros de correlação entre sorovares e virulência. No entanto, os sorovares 7, reconhecido como não virulento, foi inoculado em suínos utilizando a metodologia descrita por Aragon et al. (2012) e os sinais clínicos característicos da DG foram evidenciados. Métodos de genotipagem têm sido utilizados para classificar as cepas de *H. parasuis*. A vantagem da genotipagem em relação à sorotipagem é a possibilidade de classificação de todas as cepas.

Com aplicação das técnicas como DNA *fingerprint* e sequenciamento genético, foi confirmada a alta heterogeneidade do microrganismo (Yue et al., 2009). O *H. parasuis* foi sequenciado pela primeira vez utilizando enzimas de restrição que fazem a digestão do DNA genômico fragmentando o mesmo em sítios de restrição específicos, facilitando a análise dos fragmentos (Smart et al., 1989). Esse método de análise permitiu a caracterização de diferentes cepas da bactéria em animais de uma mesma granja. Os mesmos autores descreveram que as cepas diferentes podem ser identificadas em um único animal, ocasionando localizada ou doença sistêmica. Essas informações foram posteriormente confirmadas por técnica molecular, usando *primers* para sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias (ERIC-PCR) (Rafiee et al., 2000; Ruiz et al., 2001).

Não há uma relação direta entre genótipo e sorovares. As bactérias de uma mesma cepa podem ser de sorovares diferentes, assim como cepas de *H. parasuis* diferentes podem ser de um mesmo sorovar (Oliveira et al., 2003; Turni et al., 2010). Essas diferenças podem estar relacionadas com diferentes expressões *in vitro* dos antígenos solúveis termoestáveis ou, provavelmente, o baixo índice de reprodutibilidade das técnicas de sorotipagem. A baixa associação entre genótipo e sorovar também foi confirmada por três diferentes protocolos de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-PCR) usando *tbpA* (De La Puente Redondo et al., 2003), 16s rRNA (Olvera et al., 2012) e aro A genes (Del Río et al., 2006).

Yue et al. (2009) demonstraram o sequenciamento de uma cepa chinesa de *H. parasuis* SH0165 (número de acesso GeneBank

CP001321), sorovar 5 virulento. O genoma possuía um tamanho de 2.3 Mb constituído por mais de 2000 genes identificados. Supostos genes associados à virulência foram detectados na cepa SHSH0165, entretanto, pouco se conhece sobre a função desses genes na patogenia da DG.

A identificação dos genes relacionados à virulência é importante para diferenciar as cepas patogênicas e para desenvolvimento de vacinas eficazes. Segundo Li et al. (2016) três métodos de identificação têm sido utilizados: análise das diferenças genéticas das cepas virulentas e não virulentas, a expressão gênica dos genes de virulência das cepas *in vivo* e a criação de cepas geneticamente modificadas. O gene *d* presente no *H. parasuis*, que confere resistência às sulfonamidas, tem sido encontrado no sorovar 2, enquanto é ausente nos sorovares 1, 3 e 5 (Del Río et al., 2005). Entretanto, a relação desse gene com a virulência não é esclarecida. Acredita-se que possa ser específica de uma cepa e o gene *d* *H. parasuis* possa ser transferido por plasmídeos.

Os autores Sack e Baltés (2009) realizaram uma comparação com uma cepa Nagasaki virulenta do *H. parasuis* sorovar 5 com uma cepa não virulenta de sorovar 11. Os autores detectaram vários genes específicos do sorovar 5, responsáveis pela hemolisina (*hhdAB*), pela aquisição de ferro (*cirA*) e genes relacionados ao fago. Mesmo esses genes ausentes nas cepas não virulentas, eles não são comuns nas cepas virulentas, mostrando que eles não são indicativos da virulência do *H. parasuis*. Zhou et al. (2010), em estudos similares, identificaram 15 genes que estavam presentes apenas na cepa Nagasaki virulenta e ausente na cepa não virulenta SW114 de sorovar 3. Porém, removendo o gene relacionado ao desenvolvimento das fímbrias (*fimB*) que poderia exercer um papel importante na colonização da bactéria, os demais genes apresentaram relação com o metabolismo bacteriano.

Com o intuito de identificar os fatores de virulência do *H. parasuis*, os autores Metcalf e McInnes (2007) estudaram a expressão gênica simulando o ambiente de uma infecção *in vivo*, por exemplo, altas temperaturas, meio ácido, restrição de ferro e/ou incubação em fluido cerebrospinal. Os estudos de Jin et al. (2008) mostraram que os genes homólogos *vtaA* (responsável pela produção de adesina) e *sai B* (responsável pela utilização de

ácido siálico) são relacionados, provavelmente, a virulência da bactéria. Esses genes foram expressos *in vivo* nos pulmões infectados dos suínos inoculados com a cepa 0165 de *H. parasuis*. Cao et al. (2018) mostraram que o complexo de sinalização da transdução CpxA possui relação direta na tolerância ao estresse alcalino, oxidativo e osmótico, com a utilização de cepas do sorovar 4 mutantes, ao qual os receptores de histidina CpxA foram desligados com a utilização de um plasmídeo recombinante. Zhao et al. (2016) identificaram os genes o *vca J* responsáveis pela formação de biofilme que desempenham papel importante na colonização e infecção causada pela bactéria.

H. parasuis é um microrganismo normal da microbiota respiratória dos suínos, que coloniza o trato respiratório dos leitões, logo ao nascimento. Os estudos de Angen et al. (2007) e Cerdà-Cuéllar et al. (2010) mostraram que o *H. parasuis* foi identificado em *swabs* nasais de suínos até 6 meses, com a prevalência máxima de sua colonização atingida aos 60 dias de idade. Segundo Rafiee et al. (2000), apesar da grande variedade de cepas identificadas, normalmente, os surtos estão associados a uma única cepa mais prevalente no rebanho.

Num cenário saudável, os suínos devem desenvolver equilíbrio entre a colonização do agente e a imunidade específica para não desenvolver a doença. Entretanto, quando há uma alteração nesse equilíbrio, o *H. parasuis* tende a se multiplicar e causar a doença. Diferentes fatores podem desencadear esse desequilíbrio como temperatura ambiente instável, ventilação inadequada no galpão, desmame precoce, imunidade específica insuficiente do animal, presença de outros patógenos ou presença de uma cepa virulenta de *H. parasuis* (Aragon et al., 2012).

Os suídeos doméstico (*Sus scrofa domesticus*) e selvagem (*Sus scrofa scrofa*) são reconhecidos como os únicos hospedeiros de *H. parasuis*. A bactéria tem sido isolada de suídeos selvagens e anticorpos foram titulados nestes animais, porém a DG não foi relatada. O papel epidemiológico dos suídeos selvagens como reservatórios para infecções por *H. parasuis* precisa ser melhor estudado (Vengust et al., 2006).

A transmissão da doença de Glässer ocorre pelo contato dos animais portadores ou doentes com animais susceptíveis. No entanto, mistura de

animais de diferentes origens, como ocorre no Brasil, principalmente, no desmame ou final de creche, é um dos fatores de risco mais importante para disseminação da enfermidade. *H. parasuis* mostra-se bastante instável às condições ambientais, não havendo muitos estudos que comprovem resistência das bactérias a desinfetantes como hipoclorito e quaternário de amônia (Rodríguez-Ferri et al., 2010).

Patogênese

A patogenia da DG ainda não está totalmente esclarecida. Segundo Bouchet et al. (2009) as etapas de colonização bacteriana no trato respiratório são adesão das bactérias as células epiteliais do sistema respiratório superior, indução de apoptose celular e liberação de citoquinas. Após a colonização nasal, a bactéria atinge os pulmões e outros órgãos internos, depois de uma breve passagem pelo sangue (Fransoloso et al., 2013). A infecção sistêmica inicia-se nos pulmões e as bactérias espalham-se pelo corpo através das vias aéreas inferiores alcançando os demais órgãos (Bello-Orti et al., 2014). Nos alvéolos pulmonares as cepas virulentas de *H. parasuis* não são destruídas pelos macrófagos alveolares dos suínos (PAMs). Devido a presença da cápsula as cepas atingem a via sistêmica (Rapp-Gabrielson et al., 1992; Costa-Hurtado e Aragon, 2013), enquanto as cepas não virulentas são facilmente fagocitadas pelos PAMs (Olvera et al., 2009). Na sequência, o *H. parasuis* invade as células endoteliais provocando apoptose e produção de isoleucinas proinflamatórias IL-6 e IL-8. Esses fenômenos aparentam ter um papel importante na passagem do agente para o sangue e através da barreira hematocefálica (Aragon et al., 2012). Visivelmente, os lipopoligosacarídeos (LOS) têm um papel parcial na adesão às células endoteliais e na resposta inflamatória (Bouchet et al., 2009). Finalmente, quando *H. parasuis* atinge os órgãos internos ele se multiplica na superfície das serosas, causando lesão vascular com consequente deposição de fibrina e extravasamento de fluidos nas cavidades, característico da DG.

A sobrevivência da bactéria durante a infecção depende da aquisição de nutrientes e, no hospedeiro, alguns nutrientes são escassos como no caso do ferro livre. Entretanto, *H. parasuis* pode adquirir ferro através de receptores de superfície como TbpA e FhuA (Del Río et al., 2006). Além disso, a bactéria possui em sua superfície uma

neuroaminidase que atua como captadora de ácido siálico responsável pelo mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro (Lichtensteiger e Vimr, 1997).

H. parasuis pode atuar como patógeno primário ou secundário a outras infecções quando o organismo do animal fica imunossuprimido. Nestes casos, a bactéria que normalmente é restrita ao trato respiratório, atinge outros órgãos causando infecção sistêmica (Olvera et al., 2009). Associações epidemiológicas com agentes virais têm sido descritas na literatura, por exemplo, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (PRRSV), *Circovirus suíno 2* (PCV2) e o Vírus da influenza tipo A (Kim et al., 2002; Li et al., 2009; Van Reeth et al., 2012; 2015; Morés et al., 2015; Liu et al., 2017). De acordo com Kavanová et al. (2018) o vírus da PRRS inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos acumulados nas regiões de inflamação, o que pode favorecer ao crescimento de bactérias secundárias como o *H. parasuis*.

Sinais clínicos e lesões

Os sinais clínicos são observados, principalmente, em suínos de 4 a 8 semanas, apesar de em alguns casos afetar animais adultos, depende da imunidade adquirida na maternidade e do nível da colonização bacteriana (Oliveira, 2007). Aragon et al. (2012) evidenciaram que leitões livres de *H. parasuis* e infectados pelo patógeno, o período de incubação varia de 24h até 5 dias de acordo com a cepa infectante.

A fase superaguda da doença tem uma evolução rápida (<48h) e pode resultar em morte súbita sem demonstrar lesões características no animal (Peet et al., 1983). Na fase aguda os sinais são perceptíveis, caracterizados por febre alta (41,5°C), apatia, tosse discreta, respiração abdominal, artrite e claudicação. Quando a bactéria atinge o cérebro observam-se sinais nervosos como decúbito lateral, incoordenação motora, movimentos de pedalagem e tremores (Vahle et al., 1995). Esses sinais podem ser vistos individualmente ou coletivamente. Animais com sinais clínicos leves a moderados, normalmente, sobrevivem à fase aguda da doença e desenvolvem a fase crônica caracterizada por pelagem áspera, redução da taxa de crescimento, e eventualmente dispnéia e tosse (Little, 1970; Narita et al., 1994).

Morbidade e mortalidade dos animais afetados por DG têm sido variável. As taxas de morbidade e mortalidade em rebanhos

convencionais variam de 5-10% e em rebanhos livres do *H. parasuis* (*naïves*) podem chegar a 75% (Aragon et al., 2012). A prevalência da doença é afetada por situações de estresse ao animal e infecções virais concomitantes que afetem o sistema imune como *Circovirus suíno* tipo 2 (PCV2) (Kim et al., 2002).

Em casos de morte súbita até 48h, não há lesões características, mas o suíno pode apresentar hemorragia petequiais em diversos órgãos parenquimatosos e fluido serosanguinolento, ausência de fibrina, nas cavidades torácica e abdominal. Esses animais apresentam lesões microscópicas características de septicemia como micro hemorragias e coagulação intravascular disseminada (trombos de fibrina em diferentes tecidos como glomérulo renal, sinusóide do fígado e capilares pulmonares) (Peet et al., 1983; Valhe et al., 1997).

A doença sistêmica aguda é caracterizada pelo desenvolvimento de poliserosite fibrinosa ou fibrinopurulenta. O exsudato fibrinoso pode ser observado nas pleuras, pericárdio, peritônio (Figura 1A), líquido sinovial (Figura 1B) e meninges. Normalmente é acompanhado pela grande quantidade de fluido que se acumula nas

cavidades pleural, pericárdica, peritoneal e articulares (Oliveira et al., 2003). No mesmo animal apenas uma ou várias combinações de serosas podem estar afetadas. A pleurite fibrinosa (Figura 1C) pode ou não ser encontrada concomitante com consolidação cranioventral no pulmão devido à broncopneumonia catarral, ou raramente, broncopneumonia fibrino-hemorrágica (Little, 1970; Narita et al., 1994). A meningite fibrinosa (Figura 1D) é encontrada em 80% dos casos dos animais com sintomatologia nervosa (Aragon et al., 2012). Os suínos afetados pela fase crônica da doença têm grave fibrose no pericárdio, pleura e peritônio, provocando aderências firmes dessas serosas (Figura 1E e 1F), bem como poliartrite crônica.

Microscopicamente, os animais na fase aguda apresentam infiltrados inflamatórios acentuados nas serosas e tecidos subjacentes, compostos predominantemente por neutrófilos com moderada presença de mononucleados. Há ainda, presença moderada-acentuada de exsudato fibrinoso nas serosas afetadas, principalmente membrana sinovial, pleura, meninge e pericárdio (Peet et al., 1983; Valhe et al., 1995).

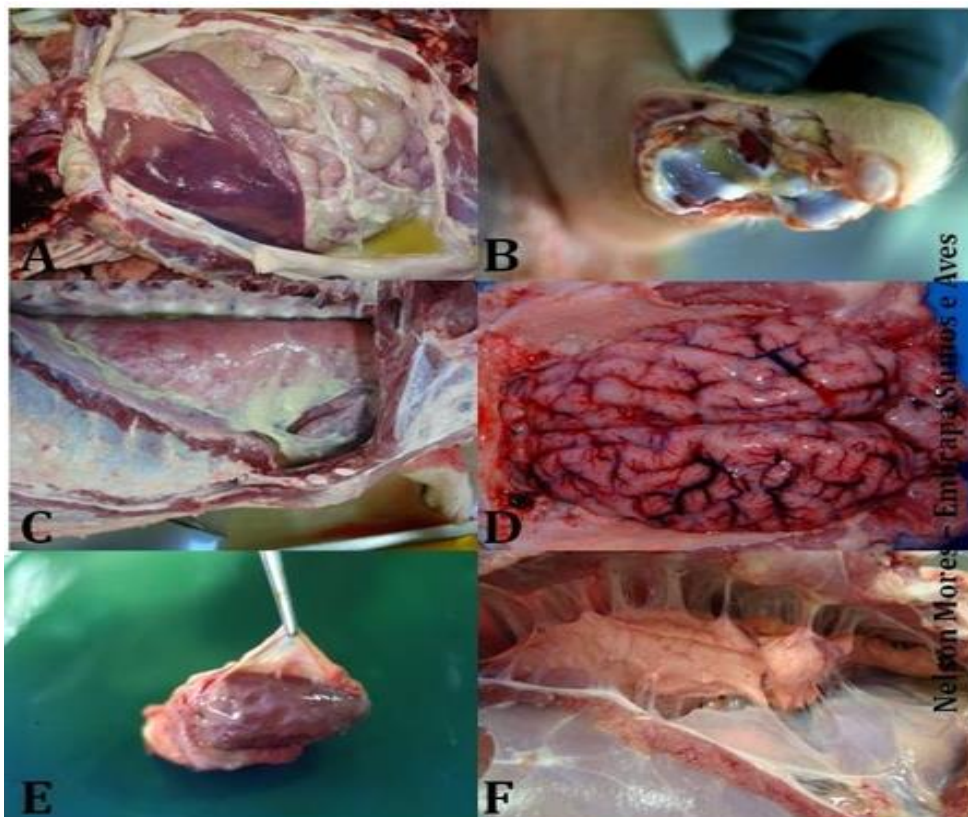


Figura 1. Achados macroscópicos da doença de Glässer. (A) Presença de exsudato serofibrinoso e purulento nas visceras e cavidade abdominal. (B) Presença de conteúdo fibrinopurulento na articulação metacarpofalângica. (C) Presença de fibrina na pleura visceral (Pleurite serofibrinosa). (D) Meningite fibrinosa. (E) Pericardite crônica: aderência firme entre o pericárdio e epicárdio. (F) Aderência do pulmão na parede torácica, pericárdio e diafragma (pleurite/pericardite crônica).

Diagnóstico

H. parasuis requer o fator V (nicotinamida adenina dinucleotídeo-NAD) para crescimento. Segundo Aragon et al., (2012), o meio ideal de cultivo para o crescimento bacteriano é o ágar chocolate enriquecido. O meio Agar sangue comum (sangue desfibrinado de carneiro) possui o fator V para o crescimento da bactéria, no entanto, o mesmo não está disponível, pois se encontra no interior das hemácias. Sendo assim, utiliza-se o *Staphylococcus* spp. no cultivo, fazendo uma estria transversal na região onde foi realizada a sementeira do *H. parasuis*. O *Staphylococcus* spp. será a fonte do fator V, necessário para as cepas *H. parasuis*, já no meio ágar chocolate as hemácias estão rompidas facilitando o acesso ao NAD. As cepas *H. parasuis* requerem 1-3 dias para aparecer em pequenas colônias marrom-acinzentadas no meio ágar chocolate, ou, pequenas colônias translúcidas não-hemolíticas no meio ágar sangue, adjacente as estrias feitas com *Staphylococcus* spp. (Biberstein e White 1969; Oliveira, 2007).

H. parasuis pode ser isolado do exsudato fibrinoso e do parênquima dos órgãos afetados, como dos pulmões lesionados em casos de pneumonia. As possibilidades de isolamento do *H. parasuis* aumentam consideravelmente se a coleta for feita com *swabs* do líquido serofibrinoso ou do exsudato colhido das cavidades (torácica e abdominal) utilizando seringa. A amostra biológica selecionada para isolamento do *H. parasuis* deve ser mantido em refrigeração e as análises laboratoriais realizadas até 24 horas. Para obter êxito no isolamento bacteriano recomenda-se que as amostras sejam colhidas de animais na fase aguda da doença e que não tenham sido medicadas com antimicrobianos. Mesmo sendo um microrganismo fastidioso o isolamento, a tipificação das cepas e antibiograma devem ser realizados (Turni et al. 2010).

O agente pode ser também identificado nos tecidos hepáticos, pericárdio, pulmão e meninge utilizando as técnicas de imunohistoquímica (IHQ) ou a hibridização *in situ* (IHS). Entretanto, a especificidade da IHS não foi totalmente esclarecida e alguns testes de IHQ apresentaram reação cruzada com *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Segalés et al., 1997; Jung et al., 2004).

As técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e quantitativa (PCRq) permitem isolar e caracterizar cepas virulentas e não virulentas do *H. parasuis*,

mesmo quando o microrganismo não está mais viável no hospedeiro (Oliveira et al., 2001; Angen et al., 2007; Turni et al., 2010; Olvera et al., 2012; Jia et al., 2017). Olvera et al. (2012) desenvolveram um teste de PCR multiplex baseado na detecção do gene *vtaAs* e pode ser utilizado para caracterizar isolados da bactéria independente do seu potencial invasivo. A informação é relevante, principalmente, quando se seleciona isolados para realização de antibiogramas ou para produção de vacinas autógenas. Jia et al. (2017), na China desenvolveram uma PCR capaz de detectar os sorovares *cepas do H. parasuis*, mostrando resultados semelhantes ao teste tradicional de hemaglutinação indireta. Todavia, como existem cepas classificadas como não virulentas capazes de causar a doença, é sempre importante utilizar testes moleculares a partir de isolados de material patológico de sítios não respiratórios como das cavidades pleural, pericárdica, abdominal, sinovial ou das meninges (Oliveira, 2007; Turni et al, 2010; Aragon et al., 2012).

A PCRq descrita por Turni e Blackall et al. 2007 demonstraram um limite de detecção de 0.83-9.5 unidades formadoras de colônia (UFC) por reação, mostrando-se mais sensível do que a PCR convencional. Os mesmos autores sinalizaram que a PCR convencional precisa ser interpretado com cautela, pois não necessariamente um animal positivo significa que o mesmo possui a doença e deve ser sempre interpretado junto com o quadro patológico.

Anticorpos contra *H. parasuis* podem ser detectados utilizando os testes de fixação do complemento (FC) ou imunoenzimático (ELISA). A FC tem sido utilizada para detecção da resposta imune em infecções experimentais (Nielsen, 1993), assim como o teste de ELISA tem sido mais utilizado em pesquisas. O ELISA indireto tem sido utilizado para caracterizar a transmissão de anticorpos maternos e demonstrar a soroconversão após a vacinação (Cerdà-Cuellar et al., 2010). Blanco et al. (2004) utilizaram kits convencionais de ELISA para avaliar o perfil de anticorpos maternos nos leitões com o intuito de identificar um período de susceptibilidade para infecção no sistema convencional de produção. O problema, entretanto, está na especificidade dos kits convencionais utilizados, pois não se tem comprovações de que o anticorpo identificado é realmente para *H. parasuis*, além de ter problemas para diferenciar os sorovares. Essas são as razões

porque os testes sorológicos são utilizados mais nas pesquisas e nos estudos de dinâmica da infecção para avaliação de programas vacinais e terapêuticos (Cerdà-Cuellar et al., 2010). Os sinais clínicos, as lesões macroscópicas e microscópicas descritas nas infecções sistêmicas por *H. parasuis* não são patognômicos, sendo assim, outros microrganismos precisam ser considerados no diagnóstico diferencial. Poliserosite fibrinosa pode ser causada por outras bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* não hemolítica afetando normalmente leitões na maternidade (Aragon et al., 2012). A toxina Shiga 2 e beta-hemolítica (Stx2e) produzida pela *E. coli* na doença do edema pode causar sinais nervosos em leitões recém-desmamados similares aos sinais nervosos causados pela infecção sistêmica por *H. parasuis*. Entretanto, microscopicamente, Stx2e não causa meningite fibrinopurulenta como as infecções por *H. parasuis*. Por outro lado, causa necrose das células musculares lisas das artérias e arteríolas (Moxley, 2000). *Mycoplasma hyorhinis* é outro importante agente que pode causar poliserosite fibrinosa em leitões na maternidade, sendo encontrado nas coinfeções com *H. parasuis* (Thacker e Minion, 2012). Quando a Glässer cursa com quadro nervoso de meningite fibrinosa, a principal doença a ser afastada é a meningite causada por *Streptococcus suis*, pois afeta suínos da mesma idade que o *H. parasuis* e pode causar sintomas e lesões similares (Aragon et al., 2012). *Pasteurella multocida* também pode causar pleurite/ pericardite com aderências na fase crônica devido à reação inflamatória severa. Porém, essa enfermidade afeta predominantemente suínos na fase de terminação e assim como na infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, podem causar nódulos necrohemorrágicos localizados nos pulmões (Oliveira Filho et al., 2015). Outros agentes podem causar claudicação e artrite assim como *H. parasuis*, por exemplo, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Mycoplasma hyosynoviae*. Porém esses agentes provocam artrites crônicas, não purulentas, em animais de terminação, diferentemente de *H. parasuis* que afeta normalmente animais jovens (Aragon et al., 2012).

Considerando que *H. parasuis* é natural da microbiota do trato respiratório superior de suínos saudáveis, a detecção na cavidade nasal ou na traqueia não é indicativo de uma infecção. Cepas de *H. parasuis* isolados de casos sistêmicos das serosas/cavidades ou de órgãos parenquimatosos associados aos sinais e lesões é confirmativo que o

animal está sendo acometido pela DG (Aragon et al., 2012).

Imunidade

H. parasuis, como qualquer outra bactéria gram-negativa, mobiliza a resposta inata e a resposta específica do sistema imune em níveis variados. A literatura mostra distintas respostas imunes mediadas por anticorpos, mas poucas informações têm sido descritas sobre resposta mediada por células (Aragon et al., 2012). A aplicação de técnicas de Imunohistoquímica (IHQ) e hibridizações *in situ* (IHS) realizadas durante o curso da infecção demonstraram que o *H. parasuis* é fagocitado por neutrófilos e macrófagos, podendo ser encontrado degenerado no interior dos fagossomos (Segalés et al., 1997). Cepas não virulentas são prontamente fagocitadas pelos PAMs, enquanto as cepas virulentas necessitam que haja opsonização pelos anticorpos específicos. Uma vez que o processo de endocitose ocorra e a bactéria seja fagocitada pelos PAMs, ela será destruída independente da virulência (Olvera et al., 2009). *H. parasuis* estimula a produção de IL-6 (em menor quantidade) e IL-8, citocinas pró-inflamatórias que são produzidas pelas células traqueais dos suínos e pelas células microvasculares endoteliais do cérebro após adesão da bactéria. A IL-8 é um potente mediador químico que atrai leucócitos, enquanto a IL-6 é um importante mediador para resposta imune aguda (Bouchet et al., 2009).

A resposta de anticorpos após a exposição de suínos ao *H. parasuis* tem sido descrita em animais vacinados, com colonização sistêmica pela bactéria e em animais convalescentes através dos testes de fixação de complemento (FC), *Western blot* e imunoenzimático (ELISA) (Nielsen, 1993; Solano-Aguilar et al., 1999). Os suínos expostos a culturas vivas de *H. parasuis* ou vacinados com bacterinas inativadas produziram de forma transitória imunoglobulina M (IgM) seguido por uma produção sólida e progressiva de imunoglobulina G (IgG). Suínos que já foram expostos ao *H. parasuis* produziram anticorpos contra o vtaAs, porém as respostas às vacinas inativadas não produziram uma quantidade ideal de anticorpos (Olvera et al., 2010). Para o desenvolvimento de uma imunidade humoral contra *H. parasuis*, o animal normalmente precisa ser exposto a células vivas ou inativadas do agente, produzindo assim anticorpos específicos. Os anticorpos específicos

opsonizam as bactérias facilitando a fagocitose pelos PAMs (Olvera et al., 2009).

Nas infecções experimentais foi observado que as vacinas homólogas garantem proteção total e as vacinas heterólogas apenas proteção parcial contra o agente, razão pela qual as vacinas, para induzir melhor proteção contra o *H. parasuis*, devem ser sorovar específicas (Nielsen, 1993; Takahashi et al., 2001). A exposição de células vivas de *H. parasuis* também gera uma imunidade protetora nos animais. Nielsen (1993) verificaram que a exposição dos animais a aerossóis com sorovares 2, 3, 4 e 7 da bactéria viva, houve resposta de anticorpos e resistiram a uma infecção induzida com cepa virulenta sorovar 5. Rapp-Gabrielson et al. (1997) descreveram que a definição da imunidade cruzada devido ao contato dos animais com os sorovares ou cepas diferentes é uma tarefa difícil.

A exposição controlada feita com culturas de cepa *H. parasuis* a leitões de cinco dias de idade demonstrou mortalidade menor no rebanho em comparação as vacinas comerciais homólogas e vacinas autógenas. As vacinas inativadas, normalmente, utilizam antígenos incompletos. Sendo assim, a produção de anticorpos não é eficiente, pois existem antígenos de virulência que somente são expressos na bactéria viva. A produção de vacinas inativadas contendo todos os sorovares não é viável, pela dificuldade em obter uma concentração adequada de antígeno para cada sorovar. (Oliveira e Pijoan, 2003). Atualmente, estão disponíveis no mercado vacinas contendo até três sorovares (Xue et al., 2014). Uma possível alternativa as vacinas inativadas são as *ghost vaccines* que têm propriedades imunogênicas similares com a bactéria original, mas não são infecciosas devido à ausência dos ácidos nucleicos. Essas vacinas ainda não estão disponíveis no mercado (Hu et al., 2013).

Os anticorpos maternos têm papel relevante na imunidade dos leitões contra o *H. parasuis*. Oliveira et al. (2003) e Blanco et al. (2004) observaram que leitões com baixa imunidade materna foram infectados com pequenas doses de inóculo de *H. parasuis*. Enquanto, leitões que receberam alto títulos de anticorpos maternos ficaram protegidos. Os estudos de Cerdà-Cuéllar et al. (2010) demonstraram a dinâmica da imunidade materna utilizando leitões infectados pelo *H. parasuis* nascidos de matrizes vacinadas e não vacinadas. De acordo com esse estudo, os anticorpos dos leitões provenientes de matrizes não

vacinadas chegavam ao nível mínimo a partir dos 20 dias de idade. No entanto, leitões provenientes das matrizes vacinadas a imunidade declinou a partir dos 60 dias de idade. O momento em que houve o declínio dos anticorpos ocorreu a colonização por *H. parasuis* no trato respiratório superior. Leitões provenientes de matrizes vacinadas tinham menor quantidade da bactéria e menor variedade de cepas no trato respiratório (Cerdà-Cuéllar et al., 2010).

Prevenção e controle

A vacinação e os antibióticos são os principais métodos utilizados no combate ao *H. parasuis*. Em alguns países, a regulamentação não permite o uso de antibióticos na profilaxia da doença, aceitando apenas o uso em casos de tratamento da infecção. Devido a essas regulamentações, a vacinação se tornou o principal meio de prevenir a infecção sistêmica e a mortalidade no rebanho (Aragón et al., 2012).

O tratamento individual via parenteral é recomendado nos suínos com sinais da doença, pois este se torna preciso e eficiente quando realizado no início do quadro clínico. O uso de medicamento na ração e na água não é indicado nesses casos porque os animais acometidos ficam prostrados, não consumindo a quantidade de ração ou água requerida para o tratamento. A susceptibilidade do *H. parasuis* a determinados antibióticos é diferente em cada região, mostrando assim a importância do antibiograma da cepa que está causando a doença no rebanho. No Reino Unido as cepas foram sensíveis à maioria dos antibióticos utilizados, enquanto na China e Espanha as cepas apresentaram resistência aos antibióticos comuns, como por exemplo, tetraciclina e beta-lactâmicos (Martín de La Fuente et al., 2007; Zhou et al., 2010). A Enrofloxacin, uma fluoroquinolona com atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, é o antibiótico mais utilizado no combate a *H. parasuis*, apesar do mecanismo de ação não ser bem definido. Sabe-se que a droga auxilia na morte intrafagocitária da bactéria nos PAMs, diminuindo a colonização sistêmica (Macedo et al., 2014). A amoxicilina é outro fármaco muito utilizado no controle de *H. parasuis*, devido sua ampla atividade contra bactérias aeróbias gram-negativas (Karriker et al., 2012). Entretanto, Olvera et al. (2007) verificaram em uma fazenda experimental, que após um ano de tratamento com amoxicilina cerca de 40% das

cepas de *H. parasuis* apresentaram resistência a este fármaco.

Um sistema de biossegurança rígido e o controle de fatores de riscos que favorecem a infecção são importantes na prevenção da doença. A mistura de leitões de diferentes origens na creche ou recria bem como a introdução de animais positivos para cepas patogênicas nos rebanhos são os principais fatores associados à ocorrência de surtos da doença. Provocar uma colonização natural nos leitões no período de amamentação (imunidade materna alta) não é efetivo devido à alta variedade de cepas circulantes no ambiente e a dificuldade dos suínos na produção de anticorpos para cepas heterólogas (Oliveira e Pijoan, 2003). O estresse dos animais causado por variações de temperatura, superlotação nas baias, brigas por mistura de leitões e desmame precoce são fatores que necessitam ser amenizados, pois podem desencadear a infecção sistêmica pelo *H. parasuis* (Macedo et al., 2009). Além disso, a higiene das instalações, com fluxo unidirecional e com limpeza e desinfecção completa das salas/instalações seguido de adequado vazio sanitário entre lotes são práticas de manejo fundamentais para controle de qualquer doença na suinocultura moderna (Aragon et al., 2012).

As vacinas comerciais ou autógenas são ferramentas importantes na prevenção da doença. No entanto, precisam conter cepas virulentas e endêmicas da propriedade para haver uma maior efetividade (Martín de La Fuente et al., 2009; Huisheng et al., 2016). Nas vacinas autógenas devem estar presentes cepas isoladas de sítios sistêmicos dos animais afetados a partir do líquido serofibrinoso das serosas afetadas (Smart e Miniats, 1989). Evitar utilizar cepas de *H. parasuis* para produção da vacina a partir de *swabs* nasais, parênquima pulmonar ou tonsilas.

Considerações finais

A DG continua sendo um problema sanitário, especialmente, para a suinocultura moderna praticada em larga escala. Com as restrições cada vez mais acentuadas ao uso de antimicrobianos, é necessário avanço nas técnicas de diagnósticos, implementação de boas práticas de manejo e controle das co-infecções que potencializam a ocorrência da DG nos plantéis de suínos.

Referências

- Angen, O.; Simone, O.; Ahrens, P.; Svensmark, B.; e Leser, T.D. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Microbiology**, 119 (2-4): 266-276. 2007.
- Aragon, V.; Segalés, J.; Oliveira S. 2012. Glässer's Disease. In: Zimmerman J.J.; Karriker L.A.; Ramirez A.; Schwartz K.J.; Stevenson G.W. (eds), **Diseases of swine**. 10^a ed., Iowa Wiley-Blackwell, 2012. p. 760-769.
- Bello-Orti, B.; Costa-Hurtado, M.; Martinez-Moliner, V.; Segalés, J.; Aragon, V. Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract. **Veterinary Microbiology**, 170(3-4): 430-437, 2014.
- Biberstein, E.L.; White, D.C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus parasuis*. **Journal of Medical Microbiology**, 2(1): 75-78. 1969.
- Blanco, I.; Galina-Pantoja, L.; Oliveira, S.; Pijoan, S.; Sánchez, C.; Canals, A. Comparison between *Haemophilus parasuis* infection in colostrums-deprived and sow-reared piglets. **Veterinary Microbiology**, 103 (1-2): 21-27, 2004.
- Bouchet, B.; Vanier, G.; Jacques M.; Auger, E.; Gottschalk, M. Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release. **Microbial Pathogenesis**, 46 (2): 108-113, 2009.
- Cai, X.; Chen, H.; Blackall, P.J.; Yin, Z.; Wang, L.; Liu, Z.; Jin, M. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. **Veterinary Microbiology**, 111 (3-4): 231-236, 2005.
- Cao, Q.; Feng, F.; Wang, H.; Xu, X.; Chen, H.; Cai, X. *Haemophilus parasuis* CPxRA two-component system confers bacterial tolerance to environmental stress and macrolide resistance. **Microbiological Research**, 206: 177-185, 2018.

- Castilla, K. S.; Gobbi, D.D.S.; Moreno, L.Z.; Paixão, R.; Coutinho, T.A.; Santos J.L.; Moreno A.M. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP e PFGE. **Research Veterinary Science**, 92 (3): 366-371, 2012.
- Cerdà-Cuéllar, M.; Naranjo, J.F.; Verge, A.; Nofrarías, M.; Cortey, M.; Olvera, A.; Segalés, J.; Aragon, V. Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Microbiology**, 145 (3-4): 315-320, 2010.
- Costa-Hurtado, M.; Aragon, V. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Journal**, 198(3): 571-576, 2013.
- De La Puente Redondo, V.A.; Navas-Méndez, J.; García del Blanco, N.; Ladrón-Boronat, N.; Gutiérrez-Martín, C.; Rodríguez-Ferri, E.F. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. **Veterinary Microbiology**, 92 (3): 253-262, 2003.
- Del Río, M.L.; Gutiérrez, C.B.; Rodríguez-Ferri, E.F. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (2): 880-882, 2003a.
- Del Río, M.L.; Gutiérrez, B.; Gutiérrez, C.B.; Monter, J.L.; Rodríguez-Ferri, E.F.; Evaluation of survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* in four liquid media and two swab specimen transport systems. **American Journal of Veterinary Research**, 64 (9): 1176-1180, 2003b.
- Del Río, M.L.; Navas-Mendez, J.; Gutiérrez-Martín, C.B.; Rodríguez-Barbosa, J.I.; Rodríguez-Ferri, E.F. Identification of *sulI* allele of dihydropteroate synthase by representational difference analysis in *Haemophilus parasuis* serovar 2. **Letter in Applied Microbiology**, 40 (6): 436-442, 2005.
- Del Río, M.L.; Navas J.; Martín A.; Gutiérrez C.; Rodríguez-Barbosa, J.; Rodríguez-Ferri, E. F. Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the *FhuA* receptor. **Veterinary Research**, 37(1): 49-59, 2006.
- Frاندoloso, R.; Pivato, M.; Martínez-Martínez, S.; Rodríguez-Ferri, E.F.; Kreutz, L.C.; Gutierrez-Martín, C.B. Differences in *Haemophilus parasuis* adherence to and invasion of AOC-45 porcine aorta endothelial cells. **BMC. Veterinary Research**, 9(1): 207, 2013.
- Hu, M.; Zhang, Y.; Xie, F.; Li, G.; Li, J.; Si, W.; Liu, S.; Hu, S.; Zhang, Z.; Shen, N.; Wang, C. Protection of piglets by a *Haemophilus parasuis* ghost vaccine against homologous challenge. **Clinical and Vaccine Immunology**, 20(6): 795-802, 2013.
- Huisheng, L.; Qiao, X.; Qiaoying, Z.; Zhanqin, Z.; *Haemophilus parasuis* vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 180: 53-58, 2016.
- Jia, A., Zhou, R.; Fan, H.; Yang, K.; Zhang, J.; Xu, Y.; Wang, G.; Liao, M., Development of serotype-specific PCR assays for typing *Haemophilus parasuis*, circulating in southern China. **Journal of Clinical Microbiology**, 55(10): 1-23, 2017.
- Jin, H.; Wan, Y.; Zhou, R., Li, L.; Luo, R.; Zhang, S.; Hu, J.; Langford, P.R.; Chen, H. Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS). **Environmental Microbiology**, 10(12): 3326-3336, 2008.
- Jung, K.; Ha, Y.; Kim, S.; Chae, C. Development of polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Medical Science**, 66(7): 841-845, 2004.
- Karriker, L.A.; Coetzee, J.; Friedship, R.M.; Prescott, J.F. Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis. In: Zimmerman, J.J.; Karriker L.A.; Ramirez A.; Schwartz K.J.; Stevenson G.W. **Diseases of swine**. 10^a ed. Iowa, Wiley-Blackwell, 2012. p. 106-118.
- Kavanová, L.; Matiasková, K.; Levá, L.; Nedbalcová, K.; Matiasovic, J.; Faldyna, M.; Salát, J. Concurrent infection of monocyte-derived macrophages with porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus and *Haemophilus parasuis*: A role of IFN α in pathogenesis of co-infection. **Veterinary Microbiology**, 225: 64-71, 2018.
- Kielstein, P.; Rapp-Gabrielson, V.J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. **Journal of Clinical Microbiology**, 30(4): 862-865, 1992
- Kim, J.; Chung, K.; Jung, T.; Cho, W.; Choi, C.; Chae, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions, and coexisting microorganisms. **Journal of Veterinary Medical Science**, 64(1):57-62, 2002.
- Li, J.; Jiang, P.; Wang, Y.; Li, Y.; Chen, W.; Wang, X.; Li, P. Genotyping of *Haemophilus parasuis* from diseased pigs in China and prevalence of two coexisting virus pathogens. **Preventive Veterinary Medicine**, 91(2-4): 274-279, 2009.
- Li, J.; Jiang, P.; Yuan, X.; Xu, L.; Kang, L.; Jiang, J.; Wang, Y. Efficient construction of *Haemophilus parasuis* mutants based on natural transformation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 80(4):281-286, 2016.
- Lichtensteiger, C.A.; Vimr, E.R. Neuroaminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. **FEMS Microbiology Letters**, 152(2), 1997.
- Lin, W.; Shih, H.; Lin, C.; Yang, C.; Chang, Y.; Lin, C.; Chiou, M. Molecular serotyping of *Haemophilus parasuis* isolated from diseased pigs and the relationship between serovars and pathological patterns in Taiwan. **PeerJ Journal**, 29(6): 1-17, 2018.
- Liu, S.; Li, W.; Wang, Y.; Gu, C.; Liu, X.; Charreyre, C.; Fan, S.; He, Q. Coinfection with *Haemophilus parasuis* serovar 4 increases the virulence of porcine Circovirus type 2 piglets. **Virology Journal**, 14: 227, 2017.
- Little, T.W. *Haemophilus* infection in pigs. **Veterinary Record**, 87(14): 399-402, 1970.
- Macedo, N.R.; Oliveira, S. R.; Lage, A.P.; Guedes, R.M.C. Epidemiologia molecular do *Haemophilus Parasuis*. **Ciência Rural**, 39(8): 2576-2582. 2009.
- Macedo, N.R. Effect of enrofloxacin in the carrier stage of *Haemophilus parasuis* in naturally colonized pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 78(1): 17-22, 2014.
- Martín de La Fuente, A.J.; Tucker, A.W.; Navas, J.; Blanco, M.; Morris, S.J.; Gutiérrez-Martín, C.B. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. **Veterinary Microbiology**, 120(1-2): 184-191, 2007.
- Martín de La Fuente, A.J.; Gutiérrez Martín, C.B.; Pérez Martínez, C.; García Iglesias, M.J.; Tejerina, F.; Rodríguez Ferri, E.F.; Effect of different vaccine formulations on the development of Glässer's disease induced in pigs by experimental *Haemophilus parasuis* infection. **Journal of Comparative Pathology**, 140(2-3): 169-176, 2009.
- Metcalf, D.S.; MacInnes, J.I. Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 71(3): 181-188, 2007.
- Morés, M.A.Z.; Oliveira Filho, J.X.; Rebelatto, R.; Klein, C.S.; Barcellos, D.E.N.; Coldebella, A.; Morés, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(8):725-733, 2015.
- Morozumi, T.; Nicolet, J. Morphological variation of *Haemophilus parauis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 23(1): 138-142, 1986.
- Moxley, R.A. Edema disease. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 16(1): 175-185, 2000.
- Narita, M.; Kawashima, K.; Matsura, S.; Uchimura, A.; Miura, Y. Pneumonia in pigs infected with pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4. **Journal of Comparative Pathology**, 110(4): 329-339, 1994.
- Nielsen R. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 34(2): 193-198, 1993.
- Nielsen, R.; Danielsen, V. An outbreak of Glässer's disease. Studies on etiology, serology and effects of vaccination. **Nordisk Veterinærmedicin**, 27: 20-25, 1975.
- Oliveira Filho, J. X.; Morés, M.A.Z.; Rebelatto R.; Agnol A.M.D.; Pileski C.L.A.; Klein C.S.; Barcellos, D.E.S.N.; Morés, N. *Pasteurella multocida* type A as the primary agent of pneumonia and septicemia in pigs. **Pesquisa**

- Veterinária Brasileira**, 35(8): 716-724, 2015.
- Oliveira, S.; Galina, L.; Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 13(6): 495-501. 2001.
- Oliveira, S.; Blackall, P.J.; Pijoan, C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. **American Journal of Veterinary Research**, 64(4): 435-442, 2003.
- Oliveira, S. *Haemophilus parasuis* diagnostics. **Journal of Swine Health and Production**, 15(2): 99-103, 2007.
- Olvera, A.; Cerdà-Cuellar, M.; Nofrarías, M.; Revilla, E.; Segalés, J.; Aragon, V. Dynamics of *Haemophilus parasuis* genotypes in a farm recovered from an outbreak of Glässer's disease. **Veterinary Microbiology**, 123(1-3): 230-237, 2007.
- Olvera, A.; Ballester, M.; Nofrarías, M.; Sibila, M.; Aragon, V. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. **Veterinary Research**, 40(3): 24-40, 2009.
- Olvera, A.; Pina, S.; Macedo, N.; Oliveira, S.; Aragon, V.; Bensaid, A. Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vitA). **Veterinary Journal**, 191(2): 213-218, 2012.
- Peet, R.L.; Fry, J.; Lloyd, J.; Henderson, J.; Curran, J.; Moir, D. *Haemophilus parasuis* septicemia in pigs. **Australian Veterinary Journal**, 60(6):187, 1983.
- Rafiee, M.; Bara, M.; Stephens, C.P.; Blackall, P.J. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, 78(12): 846-849, 2000.
- Rapp-Gabrielson, V.J.; Gabrielson, D.A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. **American Journal of Veterinary Research**, 53(5): 659-664, 1992.
- Rapp-Gabrielson, V.J.; Gabrielson, D.A.; Schamber, G.J. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. **American Journal of Veterinary Research**, 53(6): 987-994, 1992.
- Rapp-Gabrielson, V.J.; Kocur, G.J.; Clark, J.T.; Muir, S.K. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination. **Veterinarni Medicina**, 92(1): 83-90, 1997
- Rodríguez-Ferri, E.F.; Martínez, S.; Frandoloso, R.; Yubero, S.; Gutiérrez-Martín, C.B. Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and 5. **Research in Veterinary Science**, 88(3): 385-389, 2010.
- Ruiz, A.; Oliveira, S.; Torremorel, M.; Pijoan C. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(5): 1757-1762, 2001.
- Sack, M.; Baltes, N. Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Microbiology**, 136(3-4):382-386, 2009.
- Segalés, J.; Domingo, M.; Solano, G.I.; Pijoan C. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 9(3):237-243, 1997.
- Smart, N.L.; Miniats, O.P.; Rosendal, S.; Friendship, M. Glässer's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in southern Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 4(53): 339-343, 1989.
- Solano-Aguilar, G.I.; Pijoan, C.; Rapp-Gabrielson, V.; Collins, J.; Carvalho, L.F.; Winkelman, N. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, 60(1): 81-87, 1999.
- Tadjine, M.; Mittal, K.R.; Bourdon, S.; Gottscalk, M. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. **Journal Clinical Microbiology**, 42(2): 839-840, 2004.
- Takahashi, K.; Nagai, S.; Yagihashi, T.; Ikehata, T.; Nakano, Y.; Senna, K.; Maruyama, T.; Murofushi, J. 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 condition. **Journal of Veterinary Medical Science**, 63(5): 487-491, 2001.
- Thacker, E.L.; Minion, F.C. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W. **Diseases of swine**. 10^a ed., Iowa, Wiley-Blackwell, 2012. p.779-797.
- Turni, C.; Blackall, P.J. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. **Veterinary Microbiology**, 106(1-2): 145-151, 2005.
- Turni, C.; Blackall, P.J. Comparison of sampling sites and detection methods for *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, 85(5): 177-184, 2007.
- Turni, C.; Pyke, M.; Blackall, P.J. Validation of a real-time PCR for *Haemophilus parasuis*. **Journal of Applied Microbiology**, 108(4): 1323-1331, 2010.
- Valhe, J.L.; Haynes, J.S.; Andrews, J.J. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphological findings. **Journal of Veterinary. Diagnostic Investigation**, 7(4): 476-480, 1995.
- Valhe, J.L.; Haynes, J.S.; Andrews, J.J.; Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrums deprived (CDCD) swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 61(3):200-206, 1997.
- Van Reeth, K.; Brown, I.H.; Olsen, C.W. Influenza virus. In: Zimmerman, J.J.; Karriker, L.A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J.; Stevenson, G.W. **Diseases of swine**. 10^a ed., Iowa. Wiley-Blackwell, 2012. p. 557-571.
- Vengust, G.; Valencak, Z.; Bidovec, A. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. **Journal of Veterinary Medicine**, 53(1): 24-27, 2006.
- 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 Glässer's disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 168 (3-4): 153-158, 2014.
- Yue, M.; Yang, F.; Yang, J.; Bei, W.; Cai, X.; Chen, L.; Dong, J.; Zhou, R.; Jin, M.; Jin, Q.; Chen, H. Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165. **Journal of Bacteriology**, 191(4): 359-360, 2009.
- Zhao, L.; Gao, X.; Liu, C.; Lv, X.; Jiang, N.; Zheng, S. Deletion of the *vacJ* gene affects the biology and virulence in *Haemophilus parasuis* serovar 5. **Gene**, 603(1): 42-53, 2016.
- Zhao, Y.; Wang, Q.; Li, J.; Lin, X.; Huang, X.; Fang, B. Epidemiology of *Haemophilus parasuis* isolates from pigs in China using serotyping, antimicrobial susceptibility, biofilm formation and ERIC-PCR genotyping. **PeerJ Journal**, 13(6):1-16, 2018.
- Zhou, X.; Xu, X.; Zhao, Y.; Chen, P.; Zhang, X.; Chen, H.; Cai, X. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. **Veterinary Microbiology**, 141(1-2): 168-173, 2010.