KARINA SALVAGNI CASTILLA

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Haemophilus*
parasuis.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia experimental e Aplicada ao estudo das Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2056
FMVZ

Castilla, Karina Salvagni

Caracterização genotípica de cepas de *Haemophilus parasuis* /
Karina Salvagni Castilla. – São Paulo : K. S. Castilla, 2008.
75 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia experimental e
Aplicada ao estudo das Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia experimental e Aplicada
ao estudo das Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Andrea Micke Moreno.

1. *Haemophilus parasuis*. 2. Poliserosite. 3. Sorotipagem.
4. PFGE. 5. AFLP. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização genotípica de cepas de *Haemophilus parasuis*", protocolado sob o nº1500/2008, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01 de outubro de 2008.

We certify that the Research "Genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* strains", protocol number 1500/2008, under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CASTILLA, Karina Salvagni

Título: Caracterização Genotípica de Cepas de *Haemophilus parasuis*.

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu anjo da guarda, minha mãe Jeanne.

Ao meu marido Rodrigo, amor e companheiro.

A Sofia e Juan, razões da minha existência!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pela oportunidade, orientação, confiança e amizade sobre mim depositada.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio científico e financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aperfeiçoar meus conhecimentos.

As amigas e colegas Tania Alen Coutinho e Thaís S. Porfida Ferreira pela ajuda e colaboração na realização desta pesquisa.

Aos colegas Cleise Ribeiro Gomes, Débora Dirani Senna Gobbi, Luciane Tieko Shinya Zucon, Marina Moreno, Renata Paixão, Renata Rodrigues de Almeida, Sérgio Mello Teixeira Novita, pela colaboração, troca de experiências e sobretudo pela amizade possibilitando ótimos e agradáveis momentos de convivência.

Aos meus pais, Sérgio e Jeanne, pelo amor, dedicação, educação e pela oportunidade de eu poder ter escolhido esta profissão.

A minha mãe, o meu anjo, pelo seu amor incondicional, ajuda e apoio.

Ao meu marido Rodrigo pelo amor, apoio nas horas difíceis, pela sua ajuda e paciência incansável durante a elaboração desta tese.

Aos meus vizinhos Lídia e João Exman, pela ajuda, apoio e amizade, sendo que estarão eternamente guardados no meu coração.

A Deus pelo dom da vida, pelos meus filhos, pela minha saúde física e mental, e, sobretudo por sempre me mostrar o caminho do bem.

“A mente que se abre a uma grande idéia jamais
voltará ao tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

CASTILLA, K. S. **Caracterização genotípica de cepas de *Haemophilus parasuis***. [Genotype characterization of *Haemophilus parasuis* strains]. 2008. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Haemophilus parasuis é um dos agentes bacterianos que tem assumido grande importância na indústria suinícola nos últimos anos. Por muitos anos foi considerada uma doença esporádica de suínos jovens, no entanto, com o surgimento de doenças imunossupressoras ou com o aumento da criação de suínos com alto status sanitário, sua frequência vem assumindo proporções cada vez maiores. A caracterização das cepas através de métodos fenotípicos como a sorotipagem não tem sido suficiente para os estudos epidemiológicos sobre esta bactéria, uma vez que muitos isolados não são sorotipificáveis. Os objetivos deste estudo foram caracterizar os isolados através da sorotipagem, do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) e da Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), comparando os resultados obtidos. Dentre as 51 cepas de *Haemophilus parasuis* avaliadas uma foi classificada como sorotipo 2, doze como sorotipo 4, seis como sorotipo 5, quatro como 13 e sete como sorotipo 14, sendo que vinte e uma amostras não foram sorotipificáveis. Através do AFLP foi possível caracterizar todos os isolados, com um índice discriminatório de 0,98, porém esta técnica não demonstrou uma boa reprodutibilidade. Através da PFGE utilizando a enzima *Sma* I apenas 14 cepas foram genotipadas, porém com a enzima *Not* I, todas apresentaram padrões de bandas e o índice discriminatório obtido foi de 0,95. Os perfis obtidos através da PFGE com a enzima *Not* I apresentaram a melhor

correlação com os dados de origem das cepas e seus sorotipos, indicando que a técnica possui um bom potencial para aplicação em estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: *Haemophilus parasuis*. Poliserosite. Sorotipagem. PFGE. AFLP

ABSTRACT

CASTILLA, K. S. **Genotype characterization of *Haemophilus parasuis* strains.** [Caracterização genotípica de cepas de *Haemophilus parasuis*]. 2008. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

In recent years, *Haemophilus parasuis* has had a growing impact on the swine industry. In the past, *Haemophilus parasuis* infections were considered to be sporadic in young pigs. However, the incidence is increasing due to immunosuppressive diseases and the increase in the production of pigs with high sanitary status. Characterization of strains using methods based on phenotype identification is not enough to perform epidemiological studies on the bacterium, since a large percentage of isolates are nontypeable). The aim of this study was to characterize isolates according to serotyping, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), and to compare characterization results. Out of the 51 strains of *Haemophilus parasuis* evaluated in this study: one was serotype 2; twelve serotype 4; six serotype 5; four serotype 13; and seven serotype 14. Serotyping could not be performed on the remaining 21 samples. All isolates were characterized using AFLP, with a discriminatory index of 0.98, but reproducibility of this technique is not good. Regarding PFGE, 14 strains were genotyped using enzyme *Sma* I; yet, with enzyme *Not* I, all strains presented band size and discriminatory index power of 0.95. The profiles obtained using PFGE with *Not* I presented better correlation with the origin

and serotype of the strains, suggesting that this technique could be used in epidemiological studies with promising results.

Key words: *Haemophilus parasuis*. Poliserosite. Serotyping. PFGE. AFLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Eletroforese em Gel de Agarose 1,5% - Coluna 1 a 11- amostras HP10 à HP20. Coluna 12: controle positivo de <i>H. parasuis</i> , Coluna 13: Marcador 100 bp DNA Ladder (LGC Biotecnologia).....	48
Figura 2 -	AFLP - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Colunas 3 a 19 - amostras de <i>H. parasuis</i> Colunas 1 e 20 - 100 pb DNA ladder. (LGC Biotecnologia).....	51
Figura 3 -	Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Dice pela técnica de AFLP, avaliando cepas de <i>H. parasuis</i> isoladas de suínos.....	53
Figura 4-	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado - Enzima <i>Not</i> I - Coluna 1 a 14: amostras de <i>H. parasuis</i> . Coluna 15: Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences)	54
Figura 5 -	Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Dice pela técnica de PFGE com a enzima <i>Not</i> I, avaliando cepas de <i>H. parasuis</i> isoladas de suínos.....	57
Figura 6 -	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. Enzima <i>Sma</i> I - Coluna 1 a 14: amostras de <i>H. parasuis</i> . Coluna 15: Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences).....	58
Figura 7 -	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. Coluna 1 a 7(HP 29, HP27, HP4, HP13, HP14, HP15, e HP 7): clivagem com a enzima <i>Sma</i> I, Colunas 8 a 14 (HP 29, HP27, HP4, HP13, HP14, HP15, e HP 7) clivagem com a enzima <i>Not</i> I. Coluna 15: Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences)	59
Figura 8 -	Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Dice pela técnica de PFGE com a enzima <i>Sma</i> I, avaliando cepas de <i>H. parasuis</i> isoladas de suínos	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sítio de restrição da enzima <i>HindIII</i> , adaptadores e sequência de <i>primers</i> para tipagem de <i>H. parasuis</i> através do AFLP.....	42
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência dos sorotipos entre os isolados de <i>H. parasuis</i> avaliados.....	49
Tabela 2 -	Resultado da sorotipagem pelo método KRG das 51 amostras de <i>H. parasuis</i> e dados referentes aos isolamentos das cepas.....	50
Tabela 3 -	Relação das cepas de <i>H. parasuis</i> com o perfil correspondente, dentro de cada técnica genotípica testada.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

bp	Pares de bases
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dntp	Deoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
M	Molar
mg	Miligrama (10^{-3} grama)
ml	Mililitro (10^{-3} grama)
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)
ng	Nanograma
ph	Potencial Hidrogeniônico
primers	oligonucleotídeos
RNA	Acido ribonucleico
V	Volt
Xg	Força Centífuga
μ M	Micromolar (10^{-6} Molar)
μ g	Micrograma (10^{-6} grama)
μ l	Microlitro (10^{-6} litro)
λ	Lambda
Kb	Kilobase

Obs: Por terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais da sua escrita no idioma Inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	ETIOLOGIA.....	18
2.2	PATOGENIA E VIRULÊNCIA.....	21
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	26
2.4	MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO.....	28
2.4.1	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)....	30
2.4.2	Eletroforese em Gel de Agarose (PFGE)	31
2.5	DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO E TRATAMENTO	32
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	MATERIAL.....	38
4.2	MÉTODOS.....	38
4.2.1	Bacteriológico	38
4.2.2	Caracterização molecular através da PCR	39
4.2.2.1	Extração do DNA bacteriano	39
4.2.2.2	Identificação do gênero e espécie	40
4.2.3	Sorotipagem	41
4.2.4	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados. (AFLP)	41
4.2.4.1	Visualização dos produtos amplificados da PCR e do AFLP	43
4.2.5.	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	43
4.2.5.1	Extração do DNA genômico	44

4.2.5.2	Restrição do DNA genômico	45
4.2.5.3	Eletroforese	45
4.2.6	Determinação do Índice Discriminatório (DI)	46
4.2.7	Análise estatística dos fragmentos amplificados	47
5	RESULTADOS	48
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIE ATRAVÉS DA PCR .	48
5.2	Sorotipagem através do método Kielstein–Rapp-Gabrielson (KRG)	49
5.3	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) ...	51
5.4	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	54
5.4.1	Enzima de restrição <i>Not</i> I	54
5.4.2	Enzima de restrição <i>Sma</i> I	58
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Haemophilus parasuis (*H. parasuis*) é o agente etiológico de uma doença considerada esporádica em suínos jovens e relacionada a condições de estresse. O agente causa poliserosite, podendo se manifestar de forma aguda quando introduzida em rebanhos imunologicamente debilitados.

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de carne suína (GIROTTI, 2006), sendo que esta doença é uma das principais infecções bacterianas de distribuição mundial que afetam a produção industrial de suínos levando a consideráveis perdas econômicas. (KIELSTEIN; GABRIELSEN, 1992; TAKAHASHI et al., 2001). Estas perdas ocorrem devido à mortalidade elevada em leitões, alto número de refugos e depreciação de carcaças no abatedouro (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Desta maneira fica evidente a importância da escolha e padronização de técnicas que permitam a tipificação das amostras com a finalidade de caracterizar as mesmas em estudos epidemiológicos para controle e prevenção da doença.

No presente estudo amostras de *H. parasuis* foram caracterizadas fenotipicamente e genotipicamente através das técnicas de sorotipagem, Eletroforese em Gel de Campo Pulsado e Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em 1910, Glasser reportou pela primeira vez a associação de um pequeno bastonete Gram negativo com serosite fibrinosa e poliartrite em suínos, sendo por isso denominada Doença de Glasser. Em 1943, o agente foi denominado *Haemophilus suis* e em 1960 como *Haemophilus influenza suis*. Posteriormente verificou-se que este agente não requer o fator X (hemina ou outra porfirina) para o seu crescimento, recebendo então, o nome de *Haemophilus parasuis* (BIBERSTEIN; WHITE, 1969; LITTLE, 1970).

2.1 ETIOLOGIA

Pertencente ao gênero *Haemophilus*, família *Pasteurellaceae*, trata-se de uma bactéria Gram negativa, móvel e microaerófila, possuindo células pleomórficas.

O cultivo do agente é dificultado pelas suas exigências nutricionais, sendo necessária para o seu crescimento a utilização de meios suplementados com NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo), também conhecido como fator V. Uma opção freqüentemente empregada para o fornecimento do fator V é o cultivo em ágar sangue de carneiro contendo uma estria de *Staphylococcus aureus* que durante o seu crescimento produz o fator V. Sendo assim as colônias de *H. parasuis* crescem ao seu redor gerando o fenômeno descrito como satelitismo. Em agar sangue de carneiro a bactéria cresce entre 24 e 48 horas a 37°C como pequenas colônias

translúcidas e não hemolíticas (BIBERSTEIN; WHITE, 1969; QUINN et al., 1994; RAPP-GABRIELSON, 1998).

A identificação desta espécie é tradicionalmente baseada nas características morfológicas e através da realização de provas bioquímicas. Trata-se de um agente negativo para produção de urease, positivo para produção de catalase, fermentador de açúcares como glicose, sacarose, galactose, manose e frutose. Não utiliza carboidratos como lactose, manitol e xilose. Negativo para produção de indol, oxidase e não realiza a redução de nitrato para nitritos (KIELSTEIN et al., 2001).

Por se tratar de uma bactéria exigente e de crescimento lento, o desenvolvimento e a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) representou um grande avanço na identificação do agente. Os primers descritos até o momento são baseados na amplificação de genes que codificam a região 16S do RNA ribossomal (OLIVEIRA; GALINA; PIJOAN, 2001; ANGEN et al., 2007).

A metodologia descrita por Oliveira, Galina e Pijoan (2001) apresenta uma possível reação cruzada com *Actinobacillus indolicus*, o qual é um agente comensal do trato respiratório superior de suínos, o mesmo não ocorrendo com o protocolo desenvolvido por Angel et al. (2007).

A detecção do agente também foi demonstrada em 1997 por Segalés et al. através do teste de imunohistoquímica. Os autores sugeriram que a técnica foi boa para estudos de patogenicidade e diagnóstico retrospectivo, porém o teste demonstrou a desvantagem de ter uma reação cruzada com outro agente bacteriano importante em suínos, o *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

O método mais utilizado para a classificação desta bactéria é a sorotipagem. Alguns estudos tentaram classificar o agente designando os sorotipos de *H. parasuis*

de A a D, de 1 a 7, Jena 6 a Jena 12 e ND1 a ND5 (KIELSTEIN; RAPP-GABRIELSON, 1992).

Em 1992, Kielstein e Rapp-Gabrielson propuseram um esquema uniforme para designar estes sorotipos, método denominado método KRG (Kielstein-Rapp-Gabrielson). Nesta técnica a sorotipagem é realizada por imunodifusão de antígenos autoclavados relacionados a polissacarídeos presentes na cápsula celular ou na membrana externa. Através deste esquema as amostras são classificadas em quinze sorotipos denominados 1 a 15. Apesar do sucesso do método KRG, uma porcentagem relativamente grande dos isolados, segundo os autores, não são tipificáveis, sugerindo que podem existir outros sorotipos ainda não conhecidos, perda de componentes capsulares, ou falhas na metodologia que não permitem a identificação dos antígenos capsulares.

Tadjine et al. (2004) testaram a hemaglutinação indireta para sorotipagem de 300 amostras de *H. parasuis* e sugerem que este teste foi rápido e efetivo para classificação do agente, havendo uma redução no número de isolados não tipificáveis.

Angen et al. (2004), compararam a sorotipagem de 57 amostras de *H. parasuis* através dos métodos de imunodifusão (KRG) e hemaglutinação indireta. Eles observaram que ao utilizar a hemaglutinação indireta houve uma redução na porcentagem de isolados não tipificáveis de 47% para 15%. Para os isolados que foram sorotipados por ambos os métodos, houve uma boa correlação entre os resultados.

2.2 PATOGENIA E VIRULÊNCIA

A doença de Glasser é frequentemente associada a episódios esporádicos de estresse como desmame, transporte ou a presença de outros patógenos respiratórios em suínos jovens pertencentes a criações convencionais. Contudo desde o estabelecimento de rebanhos SPF (Specific Pathogen Free) ou com alto status sanitário ocorreu um aumento significativo da doença nos animais em todas as fases de produção com aumento de morbidade e mortalidade. Isto ocorre principalmente quando animais provenientes de diferentes origens são misturados ou quando ocorre a introdução de novas matrizes no rebanho, ocorrendo desta forma a introdução de uma nova cepa para a qual os animais não possuam imunidade ou não tenha imunidade cruzada com as já existentes (SMART; MINIATS; MACINESS, 1988; RAPP-GABRIELSON, 1998).

Apesar da grande ocorrência da doença em suínos, até o presente momento, os conhecimentos sobre a patogenicidade do *H. parasuis* e as variações de virulência entre cepas de mesmo sorotipo são escassos (HILL; METCALF; MacINNES, 2003).

O agente infecta apenas suínos, possuindo um tropismo particular para as membranas serosas como peritônio, pericárdio, pleura, membranas articulares, meninges e para o parênquima pulmonar (SOBESTIANSKY et al., 1999). Hoefling em 1991 descreveu a presença do agente causando uma miosite aguda nos músculos do masseter.

A disseminação ocorre através de aerossóis, porém o agente pode ser isolado tanto das cavidades nasais quanto de tonsilas de animais sadios. (HARRIS;

ROSS; SWITZER., 1969; SMART; MINIATS, 1989; VAHLE; HAYNES; ANDREWS, 1997; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004). Sendo que em pulmões de animais sadios ele usualmente não é isolado (GUTIERREZ et al., 1993; MOLLER et al., 1993)

A rápida colonização do agente em inoculações via intranasal com sorotipos virulentos é descrita em estudos como o realizado por Vahle, Haynes e Andrews (1995). Estes autores isolaram *H. parasuis* após 12 horas de inoculação da cavidade nasal e traquéia de suínos e após 36 horas do sangue e tecidos sistêmicos, sendo que os animais desenvolveram os sinais clínicos e lesões típicas da doença. Alguns trabalhos demonstraram que este patógeno coloniza a mucosa nasal precocemente de animais muito jovens, indicando deste modo que este provavelmente seja o primeiro local de colonização do agente (VAHLE; HAYNES; ANDREWS, 1997; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004).

Geralmente os sintomas e lesões da doença aparecem três a sete dias após a infecção e afetam suínos entre duas semanas a quatro meses de idade. (RAPP-GABRIELSON, 1998; SOBESTIANSKY et al., 1999; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004).

Os principais sinais clínicos e lesões são: anorexia, tremor, incoordenação motora, cianose, convulsão, claudicação, decúbito lateral e morte súbita. A necropsia pode-se observar a presença de exudato fibrinoso, serofibrinoso ou purulento nas membranas serosas afetadas, levando a um quadro de artrite, pleurite, peritonite, pericardite, meningite e pneumonia. Sugere-se que as endotoxinas produzidas pelo agente nos quadros de poliserosite induzam a coagulação intravascular disseminada, resultando na formação de microtrombos em diversos órgãos (RAPP-GABRIELSON, 1998; OLIVEIRA; PIJOAM, 2004).

H. parasuis é um patógeno causador de pneumonia. Porém ele é freqüentemente isolado de animais concomitantemente com infecções virais de

caráter imunossupressor, como Circovirose, Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína, Influenza Suína ou doenças bacterianas como a Pneumonia Enzootica agravando o quadro clínico. Podendo agir desta forma talvez como um agente secundário nestas infecções respiratórias (QUINN, 1994; SOLANO et al., 1997; RAPP-GABRIELSON, 1998; MOLLER et al, 2003; OLIVEIRA; BLACKALL; PIJOAN, 2003; BROCKMEIER, 2004).

Os fatores de virulência específicos do agente são pouco conhecidos (KIELSTEIN, 2001, TADJINE et al., 2004a).

A aderência na superfície das células epiteliais do hospedeiro é um importante fator para a colonização e patogenicidade de muitas bactérias, sendo que fímbrias ou adesinas podem ser utilizadas para intermediar esta aderência. Em 1992, Munch et al. demonstraram “in vitro” que o agente produz filamentos, estruturas como fímbrias (fimbria-like), porém os autores não esclarecem o papel que elas desempenhariam na adesão do agente.

As cepas isoladas a partir de órgãos como o pulmão, possuem um maior percentual de ausência da cápsula, porém ainda não há uma correlação exata entre a presença ou ausência da cápsula e a virulência das cepas. A perda de expressão de proteínas capsulares pode ser influenciada tanto por procedimentos “in vivo” quanto “in vitro”, sendo verificada uma significativa perda da expressão capsular após 48 horas de incubação da bactéria em meios de cultura convencionais (MORONZUMBI; NICOLET, 1986; RAPP-GABRIELSON; GABRIELSON; SCHAMBER, 1992).

As neuraminidases estão envolvidas no processo de catabolismo de ácidos siálicos. Estes por sua vez refletem no mecanismo de crescimento e persistência da bactéria na célula hospedeira. Lichtensteiger e Virm (1997) demonstraram a

presença desta enzima em *H. parasuis* e sua importância para o crescimento do agente “in vitro”, sugerindo ser um importante fator no parasitismo obrigatório do agente.

Ruiz et al. (2001) demonstraram a partir do perfil de OMPs (Outer Membrane Proteins) que em amostras isoladas da cavidade nasal de suínos sadios, ocorreu a ausência de uma banda correspondente a uma proteína de 36 a 39 kDa, a qual é tida como um possível fator de virulência. Em 2004, Oliveira e Pijoan pesquisaram um grupo de proteínas com peso molecular entre 36 e 38 kDa em 98 amostras do agente e verificaram que elas estavam presentes em 90,7% das amostras isoladas de locais sistêmicos e ausentes em 83,4% das amostras isoladas do trato respiratório superior de animais saudáveis. Segundo Ruiz et al. (2001) maiores estudos sobre a expressão capsular e perfis de proteínas das membranas externas poderão trazer importantes informações sobre a virulência das cepas.

Hill, Metcalf e MacInnes (2003) utilizaram a DDR-PCR (Differential Display Reverse Transcription - PCR) com o objetivo de identificar genes relacionados a virulência e obtiveram a expressão de sete genes diferentes em amostras de *H. parasuis* cultivadas sob condições de crescimento que mimetizam aquelas encontradas no hospedeiro. Os autores relatam a necessidade de esclarecer o papel destes genes na virulência, uma vez que todos foram encontrados nos 15 sorotipos descritos para o agente.

Bigas et al. (2006) pesquisaram o gene *thyA* que codifica a enzima *thymidylate synthase*, a qual é essencial para a síntese de dTMP (deoxythymidylate monophosphate nucleotide) e conseqüentemente para a replicação do DNA. Eles demonstraram que cepas de *H. parasuis* mutantes para este gene foram menos hábeis na colonização quando comparadas a cepas não mutantes.

Em estudo realizado por Metcalf e MacInnes (2007) foram pesquisados possíveis genes relacionados à virulência a partir do sorotipo 5. Os autores demonstraram que onze genes homólogos aos genes presentes neste sorotipo estão presentes nos quinze diferentes sorotipos de *H. parasuis*. Porém no caso do gene homólogo *cpdB*, um fragmento de 394 bp foi possivelmente associado a sorotipos com alto potencial de virulência.

Estudos envolvendo infecções experimentais indicam que alguns sorotipos possam ser mais virulentos que outros. Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992) encontraram diferenças em relação à virulência do agente para os 15 diferentes sorotipos quando inoculados intraperitonealmente em suínos SPF. Eles relataram que os sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 foram mais virulentos, causando morte ou morbidade. Já os sorotipos 2, 4, 8, e 15 causaram apenas poliserosite, sendo que os sorotipos 3, 6, 7, 9, e 11 não resultaram em sintomas clínicos ou lesões. Apesar do sorotipo 2 ter sido considerado moderadamente virulento pelos autores, Takahashi et al. (2001) confirmaram que este mesmo sorotipo foi altamente virulento quando inoculado por via intra-traqueal em animais suscetíveis.

Rapp-Gabrielson, Gabrielson e Schamber (1992) demonstraram através de inoculação intratraqueal com diferentes sorotipos de *H. parasuis* em cobaias, que os sorotipos 1 e 5 foram mais invasivos causando morte e septicemia.

Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992) demonstraram que os sorovares 1, 5, 10, 12 e 13 foram altamente patogênicos ocasionando morte em quatro dias nos animais, enquanto que os sorotipos 2, 4 e 15 foram classificados como moderadamente patogênicos e os sorotipos 3, 6, 7, 9 e 11 foram considerados não patogênicos.

Nielsen (1993) inoculou experimentalmente sete sorotipos de *H. parasuis* através da via intranasal em suínos SPF e relatou que apenas os sorotipos 1 e 5 foram capazes de produzir lesões características da doença de Glässer, diferentemente dos sorotipos 2, 3, 4, 6 e 7.

Rapp-Gabrielson et al. (1997), porém, reportaram que dentro do mesmo sorotipo existem tanto cepas virulentas quanto não virulentas. Segundo Hill; Metcalf e MacInnes (2003) não existem estudos com uma correlação absoluta ou satisfatória entre estas associações de virulência com os sorotipos.

Angen et al. (2004) observaram em 103 amostras de *H. parasuis* isoladas de animais doentes que o sorotipo 4 foi o mais prevalente nos casos de doença respiratória do que em infecções sistêmicas, nas quais predominaram as cepas não sorotipificáveis.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

H. parasuis é um agente etiológico de distribuição mundial. Estudos epidemiológicos indicam que as cepas isoladas do trato respiratório dos suínos são mais heterogêneas representando vários sorotipos e genótipos (SMART; MINIATS; MACINNES, 1988). Contrariamente, as cepas isoladas de infecções sistêmicas tendem a ser mais homogêneas (RUIZ et al., 2001) e normalmente não são as mesmas encontradas colonizando o trato respiratório superior de porcas e leitoas, principalmente as de rebanhos SPF (SMART; MINIATS; MACINNES, 1988; SMART; HUNIK; MACINNES, 1993).

Alguns autores como Rapp-Gabrielson e Gabrielson (1992); Blackall, Rapp-Gabrielson e Hampson (1996) e Kirkwood et al. (2001) demonstraram que sorotipos diferentes podem estar presentes no mesmo rebanho e também no mesmo animal ao mesmo tempo. Eles constataram também que a distribuição dos sorotipos de *H. parasuis* isolados da mucosa do trato respiratório pode ser diferente quando comparada aos isolados de animais doentes

Mousing et al. (1990), realizaram exames sorológicos para diferentes agentes etiológicos em 4800 amostras de suínos provenientes de um abatedouro na Dinamarca e encontraram 40.3% de positividade para *H. parasuis*. Entre o período de 1998 e 2002 foram analisados 103 isolados de *H. parasuis* neste mesmo país e os sorotipos mais freqüentes foram o sorotipo 5 (36%), seguido do sorotipo 13 (21%) e 4 (13%) e 15% das amostras não foram sorotipificáveis (ANGEL; SVENSMÅK; MITTA, 2004).

Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992) examinaram 290 isolados de *H. parasuis* em suínos na Alemanha. Eles constataram que 23.8% dos isolados foram classificados como sorotipo 5, 17,2% pertenceram ao sorotipo 4, sendo que 26,2% do total dos isolados não foram sorotipificáveis.

Um estudo realizado por Rapp-Gabrielson e Gabrielson (1992) em 243 amostras do agente isoladas de suínos entre os anos de 1982 e 1990 provenientes dos Estados Unidos e Canadá, demonstrou que o sorotipo 5 foi o mais prevalente (24,3%), sendo que 15,2% das amostras não foram sorotipificáveis.

Na Austrália, Blackall, Rapp-Gabrielson e Hampson (1996) isolaram em maior número os sorotipos 4, 5 e 13 de suínos doentes, sendo que 16% dos isolados não foram classificados pelo método KRG. Em 2000, Rafiee e Blackall encontraram

resultados semelhantes neste mesmo país, isolando em maior frequência os sorotipos 5 e 13.

No Brasil já foram isolados os 15 sorotipos de *H. parasuis*, sendo que em uma análise de 321 isolados, os mais encontrados foram 1, 4, 5 e 12 e 8,7% das amostras não foram sorotipificáveis (SANTOS et al., 1997).

Rúbies et al. (1999) pesquisaram a prevalência dos sorotipos de *H. parasuis* em suínos isolado entre os anos de 1993 a 1997 na Espanha e encontraram em maior percentual os sorotipos 5, 4, 2 e 13, sendo que 29,30% das 174 amostras não foram sorotipificáveis.

Tadjine et al. (2004) analisaram 300 amostras do agente isoladas na América do Norte e constataram que os sorotipos mais prevalentes foram 4, 5, 13 e 7

2.4 MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO

A variabilidade dos resultados obtidos através da sorotipagem e as dúvidas sobre a existência de fatores de virulência relacionados ao agente levaram ao desenvolvimento de diferentes métodos de genotipagem.

A caracterização molecular possui uma variedade de metodologias com especificidade, reprodutibilidade e poder discriminatório variável (HUNTER, 1990). Algumas destas técnicas empregadas para *H. parasuis* estão citadas a seguir

Utilizando a técnica de REP (Restriction Endonuclease Pattern), Smart, Hurnik e MacInness (1993) conseguiram diferenciar isolados de *H. parasuis* originados da cavidade nasal de isolados envolvidos no quadro sistêmico. Eles

verificaram que esta técnica possui a vantagem de classificar todos os isolados, incluindo os não sorotipificáveis.

Rafiee et al. (2000) utilizaram a ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR) e Ruiz et al. (2001) o perfil de proteínas da membrana externa para determinar o perfil genético de isolados não sorotipificáveis pelo método KRG. A ERIC-PCR detecta diferentes genótipos entre isolados do mesmo sorotipo, mas segundo Olvera, Calsamiglia e Aragon (2006) devido à baixa repetibilidade, a técnica não pode ser comparada entre diferentes laboratórios, sendo desta maneira impraticável para um estudo global. Segundo Oliveira e Pijoan (2004) esta técnica tem sua maior utilização na avaliação de cepas para vacinas autógenas.

De la Puente Redondo et al. (2003) encontraram doze perfis diferentes para os quinze sorotipos padrões e 33 perfis diferentes para 101 isolados analisados de *H. parasuis*. Os autores utilizaram a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilizando o gene *tbpA*, o qual codifica uma proteína da membrana externa. Esta técnica foi rápida e efetiva para tipificar o agente, tendo a vantagem de não necessitar de culturas puras, podendo ser utilizada diretamente em amostras biológicas como secreções nasais e tecidos pulmonares ou culturas com crescimento de agentes contaminantes. Segundo os autores, este método pode ser utilizado em estudos de epidemiologia e considerado alternativo para a sorotipagem.

Blackall et al. (2004) analisaram cepas de *H. parasuis* através técnica de MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) e demonstraram haver uma considerável diversidade genética entre os isolados pertencentes ao mesmo sorotipo, sugerindo que o método de sorotipagem não é o mais apropriado para tipificar cepas em estudos epidemiológicos.

Em 2006, utilizando o sistema de tipagem baseado em seqüências de DNA de múltiplos sítios (Multilocus sequence typing system - MLST), Olvera Cerdà-Cuellar e Atagon observaram que cepas supostamente não virulentas isoladas da cavidade nasal foram estatisticamente associadas a um grupo diferente das cepas isoladas de lesões clínicas.

Millan et al. (2007) descreveram pela primeira vez na literatura o uso da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado com a enzima *SmaI* para *H. parasuis*, concluindo ser esta uma boa técnica para a caracterização do agente e correlacionando os perfis observados com resistência a antimicrobianos beta lactâmicos mediada por plasmídeos.

As técnicas utilizadas neste estudo, AFLP e PFGE baseiam-se na restrição enzimática do DNA genômico bacteriano e são descritas a seguir:

2.4.1 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Esta técnica envolve a digestão do DNA bacteriano purificado com uma enzima de restrição, seguido pela ligação dos fragmentos resultantes a um oligonucleotídeo adaptador de fita dupla, o qual é complementar a seqüência de bases do sítio de restrição. Os adaptadores são desenhados de forma que os sítios de restrição originais não sejam restabelecidos após a ligação, impedindo desta forma uma nova digestão enzimática. A amplificação seletiva destes fragmentos através da PCR é realizada utilizando-se pares de *primers* complementares as

seqüências dos adaptadores, sendo analisados através da eletroforese em gel de agarose (MCLAUCHLIN et al., 2000).

Existem duas formas principais para realização da técnica. Uma utilizando duas diferentes enzimas de restrição e dois conjuntos de *primers* e a outra utilizando uma única enzima e um único *primer* para amplificação (HABU et al., 1997; HEUN et al., 1997; DUIM et al., 1999).

2.4.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Esta técnica permite a separação de fragmentos de DNA gerados por endonucleases de grandes dimensões, ou seja, de massa molecular muito elevada, o que não ocorre nos métodos eletroforéticos convencionais

Na eletroforese em gel de campo pulsado utilizam-se campos elétricos alternados que forçam as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção. O limite de resolução é atingido quando o raio de rotação da molécula de DNA excede o tamanho médio do poro de gel forçando as moléculas a percorrerem um caminho sinuoso e a mobilidade eletroforética passa a ser independente da massa molecular (SCHWART; CANTOR, 1984).

A separação do DNA é baseada no tempo em que as moléculas de maior dimensão levam a mudar de direção de migração, quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para sua reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afeta a separação das moléculas é o tempo

do pulso, que é a duração da aplicação do campo elétrico numa dada direção (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

Nesta técnica a imobilização das células bacterianas é feita numa matriz de agarose com a finalidade de evitar quebras não específicas do DNA, onde após ocorre a lise das células seguida da extração e purificação do DNA e por último a incubação com a enzima de restrição para a realização da técnica (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

Esta técnica tem sido considerada possuir um ótimo poder discriminatório e reprodutível, sendo usada na distinção de isolados clínicos de muitas espécies bacterianas e em estudos epidemiológicos (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

2.5 DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO E TRATAMENTO

O Diagnóstico é baseado no histórico do rebanho, sinais clínicos e necropsia, sendo que a confirmação do diagnóstico é realizada através de isolamento bacteriano seguido de testes bioquímicos ou genotípicos e/ou sorotipagem conforme já relatado anteriormente.

O diagnóstico diferencial deve ser realizado para alguns agentes como *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus suis*, *Salmonella Cholerasuis*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma hyorhinis*, os quais também causam poliserosite em suínos jovens.

Quando leitões provenientes de diferentes fêmeas são misturados na creche, alguns já foram precocemente colonizados pelo agente e estão protegidos devido à

presença dos anticorpos maternos. Porém estes animais tornam-se verdadeiras fontes de infecções para os animais que ainda não foram colonizados pela bactéria (SMART, 1989; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004).

A prevenção da infecção por *H. parasuis* é difícil de ser realizada. Devido à importância da imunidade natural na prevenção, o uso de vacinas tem sido um dos meios utilizados na tentativa de controlar a doença. Porém nem sempre o sucesso é obtido, principalmente quando vacinas comerciais são utilizadas (RAPP-GABRIELSON et al., 1997). Com o uso de vacinas autógenas o controle da doença tem sido mais eficiente, principalmente quando os sorotipos empregados são isolados de suínos com infecções sistêmicas (MINIATS; SMART; EWERT, 1991; SMART; HURNIK; MACINESS, 1993).

Em 1989, Smart e Miniats concluíram que animais SPF podem ser protegidos pela vacinação utilizando bacterinas de *H. parasuis* de cepas homologas às que estão circulando no plantel. Em um estudo realizado por Miniats, Smart e Ewert (1991) os autores descrevem que suínos SPF foram protegidos contra a doença de Glasser utilizando três diferentes cepas de campo. As vacinações foram realizadas nos animais com duas e quatro semanas de idade, porém os autores não esclareceram os mecanismos de proteção neste estudo.

Em 1997, Rapp-Gabrielson et al. demonstraram experimentalmente que bacterinas dos sorotipos 4 e 5 protegeram os animais que foram desafiados com cepas heterologas dos sorotipos 4, 5, 13 e 14, os quatro mais associados com a doença na América do Norte. Porém, para o desafio com os sorotipos 2 e 12 não ocorreu proteção cruzada.

Em um experimento realizado por Solano-Aguilar et al. (1999) leitoas e suas proles foram vacinadas com uma bacterina comercial contendo os sorotipos 4 e 5 de

H. parasuis. Posteriormente tanto os leitões vacinados quanto os não vacinados oriundos de mães vacinadas foram protegidos contra lesões sistêmicas quando desafiados com uma cepa homologa altamente virulenta do agente. Os autores ressaltaram que os anticorpos maternos não interferiram na vacinação dos leitões entre a primeira e terceira semana de idade.

Takahashi et al. (2001) demonstraram que foi possível obter imunidade através da proteção cruzada entre os sorotipos 2 e 5 de *H. parasuis*, sugerindo que as vacinas bivalentes possam ser utilizadas no controle da doença.

Oliveira, Galina e Pijoan (2001) realizaram um experimento colonizando porcas com *H. parasuis* e *Streptococcus suis* duas semanas antes do parto. Cinco dias após o parto, um grupo de leitões recebeu uma nova dose dos agentes. Os resultados indicam que as proles nascidas destas mães e que receberam um desafio oral aos cinco dias de idade tiveram menor morbidade e mortalidade quando comparada aos leitões que apenas tiveram contato direto com as fêmeas inoculadas.

Bak e Rising (2002) testaram a eficácia de uma vacina comercial e constataram uma clara proteção contra a doença. Eles vacinaram os animais na quinta e sétima semana de vida e desafiaram os mesmos com os sorotipos patogênicos 5, 1, 12, 13 e 14, sendo que a proteção ocorreu até o último desafio realizado as 24 semanas de idade.

Baumann e Bilkei (2002) vacinaram leitoas com uma bacterina comercial contendo os sorotipos 2, 3, e 5 de *H. parasuis* e demonstraram que as proles nascidas destas mães tiveram títulos de anticorpos muito mais altos para o agente quando comparada a proles de mães não vacinadas, sendo que estes títulos se mantiveram por pelo menos dez semanas.

Hoffman e Bilkei (2002) encontraram resultados semelhantes aos de Kirkwood et al. (2001). Eles demonstraram que em proles nascidas de mães vacinadas com um sorotipo homólogo de *H. parasuis* não houve diferença na colonização da mucosa nasal quando foram desafiadas pelo agente, quando comparada a proles desafiadas de mães não vacinadas. Porém as progênes de mães vacinadas demonstraram uma proteção parcial contra a doença.

Blanco et al. (2004) inocularam o sorotipo 5 via intratraqueal em dois diferentes grupos de leitões provenientes de uma criação positiva para *H. parasuis*. Um grupo foi amamentado normalmente e o outro foi privado do acesso ao colostro. O desenvolvimento da doença, títulos de anticorpos, sinais clínicos, lesões, isolamento microbiológico e o teste da PCR foram comparados entre os grupos, sendo que o grupo que teve acesso ao colostro teve uma proteção maior contra a doença. Demonstrando a importância dos anticorpos maternos na proteção contra os sinais clínicos da infecção.

A exposição ao agente controlada através de baixas doses do mesmo ainda na maternidade é um dos métodos propostos para diminuir a incidência da doença. Porém como os imunógenos de *H. parasuis* ainda não estão bem definidos e devido à provável heterogenicidade antigênica e genética do agente, ainda não existe uma definição sobre o mecanismo de proteção após a exposição, ou seja, se ela é sorotipo-específica, cepa-específica ou se ocorre imunidade cruzada entre os isolados (RAPP-GABRIELSON et al. 1997; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004; OLVERA; CALSAMIGLIA; ARAGON, 2006).

Uma consideração importante na vacinação autógena é que devido à possibilidade de se isolar mais de uma cepa ou sorotipo do mesmo rebanho e até do mesmo animal, é possível que a cepa selecionada para a produção da bacterina

autógena não seja a mesma causadora da doença, o que explicaria os diferentes resultados obtidos nas pesquisas de diversos autores (RAPP-GABRIELSON et al., 1997).

O tratamento normalmente é realizado com penicilina e amoxicilina, mas devido ao aumento de resistência as estas drogas nos últimos anos, o tratamento com cefalosporinas tem sido o mais preconizado. No entanto, os animais tratados que se recuperam permanecem portadores da doença (SAN-MILLAN et al., 2007).

Olvera et al. (2007) monitoraram uma granja de suínos durante um período de um ano e observaram resistência do agente a amoxicilina e nenhuma resistência a tilosina, sendo que apesar dos tratamentos antimicrobianos terem obtido sucesso, a diversidade de cepas circulantes de *H. parasuis* após um ano voltou a mesma antes dos tratamentos realizados.

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm agregado significantes contribuições para o diagnóstico e epidemiologia da infecção por *H. parasuis*. Porém os fatores de virulência, mecanismos de imunidade, testes sorológicos eficientes ou genotípicos que possam diferenciar cepas de uma simples colonização de uma infecção sistêmica e o desenvolvimento de vacinas efetivas, são áreas que ainda necessitam de muitos estudos e esclarecimentos para um controle mais preciso do agente.

3 OBJETIVOS

1. Identificação do gênero e espécie através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).
2. Caracterizar fenotipicamente identificando os sorogrupos das cepas segundo a técnica de Kielstein-Rapp-Gabrielsonn (KRG).
3. Caracterizar os isolados através do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).
4. Desenvolver e aplicar a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) na caracterização genotípica dos isolados.
5. Comparar o método fenotípico e os genotípicos na caracterização do agente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram avaliadas 51 cepas de *H. parasuis* (Tabela 1) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Estas cepas são provenientes de suínos que apresentavam quadros clínicos com artrite, peritonite, pneumonia, pleurisia e pericardite. Todas as cepas foram isoladas de pulmões.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Bacteriológico

Os isolados foram reativados a partir de uma alíquota de cada amostra mantida a -86° C. Para tanto cada isolado foi semeado em 10ml de caldo BHI (Brain Hair Infusion), suplementado com 5% de soro fetal bovino e NAD (100mg). O caldo foi incubado por 24 a 48 horas à 37°C. A partir desta cultura foi separada uma alíquota de 1ml para realização da extração do DNA do agente para realização da PCR e do AFLP.

Uma alçada da cultura crescida neste caldo foi semeada em Ágar Triptose suplementado com 10% de soro fetal bovino e NAD (10µg/ml). As placas foram incubadas à 37°C por 48 horas com 10% de CO₂.

4.2.2 Caracterização molecular através da PCR

As amostras que apresentaram bom crescimento foram confirmadas para o gênero e espécie através da PCR conforme descrito abaixo.

4.2.2.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano total foi realizada segundo o método de extração descrito por Boom, Sol e Salimans (1990). O DNA das amostras extraído por esta técnica foi posteriormente usado tanto para a técnica da PCR quanto para a de AFLP

Para extração, um microtubo contendo 1 ml da cultura bacteriana em caldo de BHI (suplementado com 5% de soro fetal bovino e NAD [100mg]) foi centrifugado a 4.500 Xg por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Ao pélete restante foi adicionado 1 ml do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100X 1ml, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 111,2 ml, EDTA 0,5M 8,8 ml) e 40 µl da suspensão carreadora (1g Terra diatomácea, HCl 50 µl e 5 ml água ultrapura). O microtubo

contendo a suspensão bacteriana foi agitado por 1 minuto e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 90 segundos 10.000 Xg. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado adicionou-se 1 ml do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 100ml). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos a 10.000 Xg, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona nas mesmas condições anteriores, com exceção da centrifugação com a acetona que durou dois minutos. Os microtubos contendo os péletes tratados com acetona foram mantidos em estufa a 37° C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foi adicionado 100µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo, este foi agitado por 1 minuto e mantido a 56 °C por 10 minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 Xg e o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização na PCR.

4.2.2.2 Identificação do gênero e espécie

As amostras foram confirmadas quanto o gênero e espécie através da PCR segundo descrito por Oliveira, Galina e Pijoan (2001).

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles dos *primers* específicos para o agente, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação a 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C e 1 minuto a 72° C.

4.2.3 Sorotipagem

Para identificação do sorogrupo capsular através do método Kielstein-Rapp-Gabrielson as 51 cepas de *H. parasuis* foram enviadas ao laboratório de Microbiologia Veterinária Microvet, localizado em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

4.2.4 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por Mclauchiln et al. (2000) utilizando-se a endonuclease de restrição *Hind* III como única enzima. As amostras utilizadas encontram-se no Quadro 1, sendo que o procedimento foi repetido para avaliar as condições de reprodutibilidade do teste.

Para clivagem do DNA bacteriano, 10 µl do DNA de cada amostra foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 µl. O tubo foi incubado à 37°C por 12 a 18 horas.

Uma alíquota de 5 µl do DNA clivado foi adicionada a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 µl. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80 °C por 10 minutos.

A sequência de bases dos primers utilizados para ligação e amplificação e sua posição relativa ao sítio de restrição da enzima *Hind*III esta apresentado no quadro 1 .

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µl do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 10 pmoles do primer (HI-G), 1,0 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à desnaturação a 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 60° C e 2,5 minutos a 72°C.

Quadro 1 - Sítio de restrição da enzima *Hind*III, adaptadores e sequência de primers para tipagem de *H. parasuis* através do AFLP

(1) Fragmento <i>Hind</i> III	5' AGCTT----//----A 3' 3' A----//----TTCGA 5'
(2) Adaptador	ADH1 5' ACGGTATGCGACAG 3' ADH2 3' GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5'
(3) Primer específico HI-G	5'GGTATGCGACAGAGCTTG 3'

(1) Sítios de restrição da endonuclease *Hind* III, (2) Sequência dos dois oligonucleotídeos complementares que formam os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, (3) Sequência do primer utilizado na amplificação dos fragmentos.

4.2.4.1 Visualização dos produtos amplificados através da PCR e do AFLP

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5% para a PCR e 2,0 % para o AFLP, utilizando-se tampão TBE. Após a corrida o gel foi colocado em uma solução de Brometo de Etídio (5µg/ml) por 15 minutos e descorado em água por 20 minutos. O gel foi então fotografado através de luz ultravioleta em um sistema de fotodocumentação convencional. Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de pares de base 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Brasil Ltda).

4.2.5 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

As 41 cepas de *H. parasuis* foram preparadas para análise através do PFGE (Tabela 1) segundo descrito por Struelens, De Ryck e Deplano (2001) com algumas modificações.

Os blocos de agarose contendo o DNA genômico foram preparados com cultivo bacteriano incubado à 37°C por 48 horas em caldo BHI suplementado com 5% de soro fetal bovino e NAD (100 mg). Um volume de 9 ml de cada amostra foi adicionado a um tubo de fundo cônico de 15 ml e o mesmo foi centrifugado a 15000 Xg por 5 minutos à 4 C° e o sobrenadante foi descartado. O pélete foi ressuspensão em 1000 µl de tampão Pett IV (2 M Tris-HCl [ph 8], 5 M NaCl, 0,5 M EDTA). Esta suspensão foi homogenizada e centrifugada a 15000 Xg à 4 C° e o sobrenadante

foi novamente desprezado. Após esta etapa, o pélete foi ressuspenso em 500 µl de tampão Pett IV. A esta suspensão bacteriana foi misturada a 500 µl de agarose a 2%. Uma alíquota de 100 µl desta mistura foi adicionada ao molde, o qual permaneceu em temperatura ambiente até solidificação dos blocos.

4.2.5.1 Extração do DNA genômico

Os blocos de agarose armazenados em tubos contendo as amostras bacterianas foram incubados com uma solução de lise (3465 µl de tampão de lise + 35 µl de lisozima [100 mg/ml]) por 2h a 37° C. Em seguida a solução de lise foi substituída pela solução ESP (3385µl de tampão ES [0,5 m EDTA, 1% Na – laurysarcosine sodium salt] + 115 µl de proteinase K) e os blocos foram mantidos em banho-maria a 56° C overnight.

Após este período esta solução foi descartada e foi adicionado 2 ml de H₂O MilliQ®, sendo os blocos mantidos sob agitação por 15 minutos. Em seguida, a H₂O MilliQ® foi descartada e foi adicionado aos tubos 2 ml de tampão TE (1970 µl) [2M Tris HCL, 0,5 M EDTA]+ PMSF (30µl [100mM]), sendo este incubado por 30 minutos sob agitação. A lavagem com TE-PMSF foi repetida por 2 vezes. Em seguida a solução TE-PMSF foi descartada e foi adicionado 2 ml H₂O MilliQ® e os tubos foram incubados por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação.

Após o processo de lise, os blocos foram lavados uma vez com H₂O MilliQ® (3ml) e três vezes com tampão de eluição (3ml), cada lavagem foi de 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Os blocos foram mantidos a 4° C em

microtubos com 900 µl de tampão TE até o momento da clivagem com a enzima de restrição.

4.2.5.2 Restrição do DNA genômico

Para a restrição do DNA genômico uma fração (1/3) dos blocos de agarose, contendo a amostra, foi submetida ao processo de pré-restrição. Para tanto foi adicionado ao microtubo contendo o bloco 225µl de H₂O MilliQ® e 25µl de tampão de enzima e o microtubo foi incubado durante 1 hora em temperatura ambiente. Após este período foi removida solução de pré-restrição e adicionado ao microtubo 50µl da mistura de restrição (5 µl de tampão da enzima, 2 µl da enzima de restrição, 43µl de H₂O MilliQ®), e este foi incubado por 24 horas a 30°C quando da utilização da enzima *Sma* I (Invitrogen) e a 37° C quando da utilização da enzima *Not* I (GE Healthcare).

4.2.5.3 Eletroforese

Para a realização da eletroforese foi utilizado o sistema CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad).

Os blocos contendo as amostras bacterianas foram colocados em gel de agarose 1% (FMC BioProducts), e a corrida foi conduzida em dois períodos. Um período de

11 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 7,0 segundos e final de 12 segundos e o outro período de 13 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 20 segundos e final de 40 segundos, em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA 50 mM Tris, 45 mM Borato, 0,5 mM EDTA [pH 8.4]) mantido a 14°C.

O gel foi corado por 1h em uma solução de brometo de etídio (5 mg/mL) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amershan Biosciences). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences).

4.2.6 Determinação do Índice Discriminatório (DI)

Os resultados da caracterização genotípica do AFLP e PFGE foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), sendo possível calcular o Índice Discriminatório a partir da seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Onde N é o número de amostras da população teste, s é o número de diferentes tipos e n_j é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocados em diferentes grupos.

4.2.7 Análise estatística dos fragmentos amplificados

Para análise estatística dos fragmentos amplificados pelas técnicas genotípicas empregadas foi utilizado o programa "Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System" (NTSYS), sendo a similaridade das amostras estimada através do coeficiente de Dice. A partir deste foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA), que são representados na forma de dendrograma.

5 RESULTADOS

Os resultados correspondentes a cada técnica estão descritos a seguir.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO E ESPÉCIE ATRAVÉS DA PCR

As 51 cepas selecionadas para este estudo foram caracterizadas como *H. parasuis* através da PCR confirmando o gênero e espécie. Todas as amostras apresentaram uma banda de 821 pb (Figura 1).

Figura 1 - Eletroforese em Gel de Agarose 1,5% - Coluna 1 a 11- amostras HP10 à HP20. Coluna 12: controle positivo de *H. parasuis*, Coluna 13: Marcador 100 bp DNA Ladder (LGC Biotecnologia)

5.2 SOROTIPAGEM ATRAVÉS DO MÉTODO KIELSTEIN-RAPP-GABRIELSONN (KRG)

Os sorotipos 4, 5 e 14 foram os mais freqüentes, sendo seguidos dos sorotipos 13 e 2 (Tabela 1). No entanto mais de 41% destas amostras foram caracterizadas como não sorotipificáveis. O resultado de cada amostra submetida à sorotipagem encontra-se na tabela 2.

Tabela 1 - Freqüência dos sorotipos entre os isolados de *H. parasuis* avaliados.

Sorotipo	Número de amostras	%
2	1	1,9
4	12	23,6
5	6	11,8
13	4	7,8
14	7	13,7
Não sorotipável	21	41,2
Total	51	100

Tabela 2 - Resultado da sorotipagem pelo método KRG das 51 amostras de *H. parasuis* e dados referentes aos isolamentos das cepas

CEPA	SOROTIPO	ANO	ESTADO	LEITÃO	GRANJA
HPS1	5	2004	SP	L1	G1
HPS3	5	2004			
HPS4	4	2004			
HPS5	Não sorotificável	2004	SP	L2	G2
HPS6		2004			
HPS7		2004			
HPS8	5	2004	SP	L3	G3
HPS10	4	2004			
HPS11	4	2004			
HPS12	4	2004	SP	L4	
HPS13	13	2005			
HPS14	5	2005			
HPS15	5	2005	SP	L6	G5
HPS16	Não sorotificável	2005			
HPS17		2005			
HPS18		2005			
HPS19	14	2005	SP	L8	G7
HPS20	Não sorotificável	2005			
HPS21		2005			
HPS22	Não sorotificável	2005	SP	L9	G8
HPS23		2005			
HPS24		2005			
HPS25	Não sorotificável	2005	SP	L10	G9
HPS26		2005			
HPS27	4	2005	SP	L11	G10
HPS28	4	2005			
HPS29	4	2005			
HPS30	Não sorotificável	2005	PR	L12	G11
HPS31		2005			
HPS32	5	2006	PR	L13	G12
HPS33	4	2006			
HPS34	Não sorotificável	2006	SP	L14	G13
HPS35		2006			
HPS36		2006			
HPS37	Não sorotificável	2006	MT	L15	G14
HPS38		2006			
HPS39	Não sorotificável	2006	SP	L17	G16
HPS40		2006			
HPS41		2006			
HPS42	4	2006	MT	L18	G17
HPS43	Não sorotificável	2007			
HPS44		2007			
HPS45	14	2007	PR	L19	G18
HPS46	14	2007			
HPS47	14	2007			
HPS48	Não sorotificável	2007	MT	L21	G19
HPS49		2007			
HPS50	Não sorotificável	2007	MG	L22	G20
HPS51		2007			
HPS52		2007			
HPS53		2007			

5.3 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Através do AFLP foram avaliadas 50 cepas selecionadas para o estudo (Tabela 3). A partir dos resultados obtidos com esta técnica foi determinado um total de 38 perfis diferentes considerando-se a presença ou ausência de uma ou mais bandas. Foi possível visualizar de 5 a 16 bandas com tamanho variando entre 400 e 2000 pb (Figura 2).

Figura 2 - AFLP - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Colunas 3 a 19 - amostras de *H. parasuis*. Colunas 1 e 20 - 100 pb DNA ladder. (LGC Biotecnologia)

No dendrograma obtido a partir da análise estatística (Figura 3) foi possível observar que apenas os perfis A7 e A25 agruparam isolados provenientes de diferentes granjas e animais. Perfis como A1, A6, A22 e A34, reuniram amostras de

mesma granja e mesmo animal, sendo que no perfil A8 encontram-se amostras de leitões diferentes, porém pertencentes à mesma granja.

A partir da análise do dendrograma foi possível identificar um grupo principal denominado grupo Ib. Este grupo foi subdividido nos subgrupos IIa e IIb reunindo 34 perfis e 46 amostras. O coeficiente de similaridade entre os isolados do subgrupo Ib variou de 30 a 100%. O grupo Ia foi composto por apenas dois perfis e duas amostras com cerca de 50% de similaridade entre si, sendo uma de sorotipo 4 e outra não sorotipificável.

O subgrupo Va caracterizou-se por amostras não sorotipificáveis e amostras dos sorotipos 4, 5 e 14, provenientes de diferentes granjas, estados e isolados em três anos distintos, sendo divididas em treze perfis. O subgrupo Vb reuniu oito perfis, com cepas de sorotipos 4, 5, 14 e não sorotipificáveis. Estas cepas foram provenientes de diferentes granjas e anos de isolamento, porém todas do estado de São Paulo. O subgrupo IVb reuniu o maior número de amostras não sorotipificáveis em seis perfis diferentes, pertencentes a diferentes anos de isolamento, granjas e leitões do Estado de São Paulo. Também no subgrupo IIIb predominaram amostras não sorotipificáveis em quatro diferentes perfis. Todos os quatro isolados pertencentes ao sorotipo 13 estão reunidos no subgrupo IIb, provenientes de São Paulo e Minas Gerais.

O Índice Discriminatório (ID) para a técnica de AFLP foi de 0,98, porém não se obteve uma boa reprodutibilidade dos resultados quando o procedimento desta técnica foi repetido com as mesmas cepas.

Figura 3 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Dice pela técnica de AFLP avaliando cepas de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos. (NS- Não sorotificável)

5.4 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Esta técnica foi testada para duas enzimas de restrição diferentes: enzimas *Not* I e *Sma* I.

5.4.1 Enzima de restrição *Not* I

Através da técnica de PFGE utilizando a enzima de restrição *Not* I foram avaliadas 40 das 51 cepas selecionadas para o estudo (Tabela 1), uma vez que 11 cepas não estavam viáveis no momento da realização da técnica. Cada isolado gerou de dois a sete fragmentos de tamanho variando entre 48,5 e 436,5 Kpb (Figura 4). Observou-se a partir destas 40 cepas a existência de 20 perfis distintos (Figura 5), considerando-se a presença ou ausência de uma ou mais bandas. O procedimento foi repetido para todas as amostras e demonstrou boa reprodutibilidade.

Figura 4: Eletroforese em Gel de Campo Pulsado - Enzima *Not* I - Coluna 1 a 14: amostras de *H. parasuis*. Coluna 15: Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences)

Na figura 5 pode-se observar o dendrograma obtido a partir da análise estatística dos resultados da PFGE com a enzima *Not I* e a relação dos isolados em cada perfil com o sorotipo, animal, granja, ano e estado do isolamento.

Analizando a Figura 5 foi possível observar que de um modo geral as cepas provenientes de um mesmo animal e mesma granja foram alocadas no mesmo perfil ou grupos próximos. Em alguns casos, isolados provenientes de diferentes animais, granjas e anos de isolamento encontram-se dentro do mesmo perfil. Assim como ocorreu também que isolados da mesma granja e do mesmo animal foram reunidos em perfis ou em grupamentos diferentes.

Foi possível identificar dois grupos principais. O grupo I representado pelos subgrupos IA, IB, IC, ID e IE, o qual reuniu 19 perfis e 38 amostras e o grupo II composto pelo grupo IIF contendo apenas duas amostras. O coeficiente de similaridade entre os isolados dos cinco subgrupos variou de 0 a 100%.

O subgrupo Ia caracterizou-se por amostras não sorotipificáveis e uma cepa de sorotipo 4, reunindo ainda quatro cepas de uma mesma granja e mesmo animal de origem. O subgrupo IB apresentou cepas não sorotipificáveis e cepas do sorotipo 14, reunindo amostras de duas granjas e dois animais em quatro diferentes perfis. O maior subgrupo, o IC contendo 17 amostras reuniu cepas pertencentes aos sorotipos 4, 14, 5 e não sorotipificáveis em apenas cinco perfis, no entanto, avaliando os isolados com 100% de similaridade neste grupamento, é possível verificar a discriminação de cepas do sorotipo 5 em uma única chave. O subgrupo ID apresentou uma maior heterogeneidade de isolados, reunindo cepas de sorotipo 2, 5, e uma amostra não sorotipificável todas do estado de São Paulo. O subgrupo IE também foi heterogêneo reunindo amostras não sorotipificáveis, 5 e 13 pertencentes a diferentes granjas, estados e ano de isolamento em quatro perfis. O subgrupo IIF

apresentou duas cepas não sorotificáveis isoladas do mesmo animal dentro do mesmo perfil.

O Índice Discriminatório (ID) para a técnica de PFGE utilizando a enzima *Not I* foi de 0,95, sendo que o teste foi reprodutível para todas as amostras.

Figura 5 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Dice pela técnica de PFGE com a enzima *Not I*, avaliando cepas de *H. parasuis* isoladas de suínos. (NS- Não Sorotipificável)

5.4.2 Enzima de restrição *Sma* I

Através da técnica de PFGE utilizando a enzima de restrição *Sma* I foram avaliadas as mesmas 40 cepas selecionadas para o estudo com a enzima *Not* I (Tabela 1).

Diferentemente do que ocorreu com a enzima *Not* I, com a enzima *Sma* I apenas treze amostras apresentaram fragmentos de DNA, representados por bandas, que variaram entre 48,5 e 436,5 Kpb (Figura 6). Para cada uma das amostras que não apresentaram nenhum resultado com a enzima o procedimento foi repetido quatro vezes.

Foi observada a partir destas treze cepas a existência de seis perfis distintos (Figura 8), considerando-se a presença ou ausência de uma ou mais bandas.

Figura 6 - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. Enzima *Sma* I - Coluna 1 a 14: amostras de *H. parasuis*. Coluna 15: Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences)

Na figura 7 podem-se observar dentro do mesmo gel sete amostras clivadas com as duas enzimas. Nas colunas 1 a 7 foram colocadas as amostras HP 29, HP 27, HP 4, HP 13, HP 14, HP 15, e HP 7 clivadas com a enzima *Sma* I e nas colunas 8 a 14, foram aplicadas os mesmos blocos com as mesmas amostras clivadas com a enzima *Not* I.

Figura 7 - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. Coluna 1 a 7(HP 29, HP27, HP4, HP13, HP14, HP15, e HP 7): clivagem com a enzima *Sma* I, Colunas de 8 a 14 (HP 29, HP27, HP4, HP13, HP14, HP15, e HP 7) clivagem com a enzima *Not* I. Coluna 15: Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences)

A partir do dendrograma (Figura 8) foi possível identificar dois grupos principais. O grupo I representado pelos subgrupos Ia e Ib, o qual reuniu cinco perfis e 12 amostras e o grupo II com apenas um perfil e uma amostra.

Apenas no perfil PS1 do subgrupo Ia observou-se a reunião de amostras de diferentes sorotipos (4, 2 e não sorotipificável). Nos perfis PS2, PS 3, PS4 e PS5 todas as cepas foram não sorotipificáveis. Isolados de um mesmo animal e granja foram reunidos no mesmo perfil (PS2, PS3 e PS5) ou em perfis diferentes, como é o caso do leitão 14, onde um isolado encontra-se no perfil PS1 e outro no perfil PS4.

Figura 8 - Dendrograma baseado em UPGMA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Dice pela técnica de PFGE com a enzima *Sma* I, avaliando cepas de *H. parasuis* isoladas de suínos. (NS- Não sorotipificável)

Tabela 3 - Relação das cepas de *H. parasuis* com o perfil correspondente, dentro de cada técnica genotípica testada

Cepas <i>H. parasuis</i>	TÉCNICA GENOTÍPICA		
	AFLP (PERFIL)	PFGE (PERFIL)	
		Enzima <i>NofI</i>	Enzima <i>SmaI</i>
HP 1	A15	PN17	NF
HP 3	A32	PN15	NF
HP 4	A9	PN4	NF
HP 5	A30	PN9	NF
HP 6	A4	PN9	NF
HP 7	A12	PN12	NF
HP 8	A18	PN10	NF
HP 10	A3	PN11	NF
HP 11	A19	PN11	NF
HP 12	A20	PN11	NF
HP 13	A33	PN16	NF
HP 14	A11	PN10	NF
HP 15	A10	PN10	NF
HP 16	A37	PN1	NF
HP 17	A22	PN6	PS5
HP 18	A22	PN6	PS5
HP 19	A1	PN5	NF
HP 20	A1	PN7	NF
HP 21	A1	PN8	NF
HP 22	A36	PN20	PS3
HP 23	A28	PN20	PS3
HP 24	A14	PN16	NF
HP 25	A24	PN14	PS6
HP 26	A38	PN14	PS1
HP 27	A13	PN9	NF
HP 28	A23	PN9	NF
HP 29	A5	PN9	NF
HP 30	A6	PN18	NF
HP 31	A6	PN18	NF
HP 32	A31	PN19	NF
HP 33	A27	PN13	PS1
HP 34	A25	PN13	NF
HP 35	A28	PN13	PS1
HP 36	A2	PN13	PS4
HP 37	A29	PN3	PS3
HP 38	A21	PN9	NF
HP 39	A25	PN2	PS2
HP 40	A16	PN2	PS2
HP 41	NT	PN2	PS2
HP 42	A17	PN2	NF
HP 43	A7	NT	NT
HP 44	A8	NT	NT
HP 45	A8	NT	NT
HP 46	A8	NT	NT
HP 47	A8	NT	NT
HP 48	A7	NT	NT
HP 49	A36	NT	NT
HP 50	A34	NT	NT
HP 51	A34	NT	NT
HP 52	A34	NT	NT
HP 53	A34	NT	NT

6 DISCUSSÃO

A sorotipagem foi uma das primeiras técnicas a ser desenvolvida para estudo do *H. parasuis* originando as classificações iniciais que buscavam correlacionar as características capsulares protéicas de cada cepa com correspondente virulência ou patogenicidade.

De acordo com Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992), foram determinados 15 sorotipos distintos para o agente. No entanto, restam de 15 a 41% de isolados classificados como não sorotipificáveis que podem ou não ocasionar doença. A dificuldade em sorotipificar estas amostras pode estar relacionada ao método de classificação, seja a imunodifusão (KRG) ou a técnica de hemaglutinação indireta, assim como a elevada heterogenicidade do agente (MOROZUMI; NICOLET, 1986; RAPP-GABRIELSON; GABRIELSON; SAHAMBER, 1992). Alguns autores relatam a ocorrência de alterações ou perdas de proteínas da cápsula decorrente de sucessivas reativações, e descrevem maior frequência destas alterações em isolados de origem pulmonar, outros sugerem que a impossibilidade de sorotipificar parte dos isolados esteja relacionada à existência de mais sorotipos além dos 15 descritos (OLIVEIRA; BLACKALL; PIJOAN, 2003; OLIVEIRA; PIJOAN, 2004a).

Os sorotipos de maior prevalência mundial são 4, 5 e 13, os quais são descritos possuindo uma patogenicidade moderada a alta sendo, portanto, envolvidos nos quadros de poliserosite (KIELSTEIN; RAPP-GABRIELSON, 1992, BLACKALL et al., 1996; RUBIES et al., 1999; ANGEN; SVENSMÅK; MITTAL, 2004; TADJINE et al., 2004).

No presente estudo, os sorotipos encontrados correspondem aos de maior prevalência, sendo também isolado o sorotipo 2 e 14. Mais de 41% das amostras

foram classificadas como não sorotipificáveis. Este resultado é similar ao descrito por Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992). Os resultados obtidos estão de acordo não apenas com a literatura internacional, mas também com a prevalência indicada por Santos et al. (1997) no único estudo até o presente momento sobre os sorotipos isolados no Brasil.

Dois sorotipos diferentes, 4 e 5, foram isolados de um mesmo animal, o leitão 3 da granja 3, sendo que vários autores relatam a ocorrência de mais de um sorotipo em um mesmo rebanho ou até no mesmo animal (SMART; MAINIATS; MACINESS, 1988; SMART et al., 1989; OLIVEIRA; BLACKALL; PIJOAN, 2003).

Várias técnicas têm sido avaliadas para caracterização de cepas de *H. parasuis*. Smart et al. (1993) descrevem a utilização da técnica de restrição enzimática REP. Blackall et al. (1997) analisaram cepas do agente através técnica de MEE. Rafiee et al. (2000) utilizaram a ERIC-PCR e Ruiz et al. (2001) o perfil de proteínas da membrana externa para determinar o perfil genético de isolados não tipificáveis pelo método KRG. De la Puente et al. (2003) utilizaram a técnica de RFLP após a amplificação do gene *tbpA*, o qual codifica uma proteína da membrana externa. Olvera et al. (2006) relatam a realização do seqüenciamento parcial do gene *hs p60* como um marcador molecular para *H. parasuis*.

O presente estudo é o primeiro que avalia a aplicação do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) empregando uma única enzima de restrição (*Hind* III) na genotipagem de cepas de *H. parasuis*. Observou-se que todos os isolados avaliados foram tipificáveis e houve uma boa correlação entre a origem dos isolados e seus agrupamentos com um ID de 0,98.

Diferentemente dos resultados com outras espécies avaliadas por esta metodologia, houve variação nos resultados obtidos e na clareza das bandas

quando o procedimento foi repetido nas amostras isoladas. Oliveira et al, (2004) também relatam que houve variabilidade nos resultados obtidos na técnica de AFLP utilizando duas enzimas de restrição para este mesmo agente. Porém segundo os autores o AFLP continua sendo uma técnica bastante atrativa para análise desta espécie bacteriana, no entanto, são necessários maiores investimentos na padronização da técnica e talvez seja necessária a avaliação de outras enzimas de restrição.

Apesar de ser considerada a técnica padrão ouro para a genotipagem de agentes bacterianos, até o presente momento apenas Millan et al. (2007) descreveram a utilização da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para caracterização de *H. parasuis* relacionando a genotipagem dos isolados com resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos mediada por plasmídeos.

A sorotipagem classificou as 40 cepas utilizadas no PFGE em apenas cinco diferentes sorotipos (2, 4, 5, 13 e 14), sendo que 19 destas não foram sorotipificáveis. Através da técnica do PFGE o presente estudo utilizando a enzima *Not I* encontrou 20 perfis distintos para estas mesmas amostras, tendo a vantagem de tipificar por este método as cepas não sorotipificáveis. A única ressalva em relação ao PFGE com esta enzima é o baixo número de bandas apresentado que variou de duas a sete bandas.

Dentro destes 20 perfis distintos, isolados de diferentes animais e granjas encontram-se dentro de um mesmo perfil, assim como isolados de um mesmo animal ou granja estão classificados em perfis diferentes. Porém a maioria das cepas provenientes do mesmo animal e granja encontra-se no mesmo perfil ou em perfis próximos.

O uso do PFGE utilizando a enzima de restrição *Sma* I não possibilitou a caracterização de todas as cepas, pois 67,5% (27/40) das mesmas não apresentaram nenhum resultado. Este fato pode estar relacionado a ausência do sítios de restrição específico para esta enzima no genoma de algumas cepas. Millan et al. (2007) relatam ter tido sucesso na utilização da PFGE com a enzima *Sma* I, porém estes autores testaram apenas 17 cepas de *H. parasuis*.

A genotipagem bacteriana é uma ferramenta bastante utilizada em estudos epidemiológicos, podendo ser utilizada para definir a prevalência das cepas que afetam os rebanhos selecionando deste modo, isolados representativos para serem usados em vacinas autógenas. As duas técnicas utilizadas neste estudo, AFLP e PFGE, baseiam-se na restrição enzimática do DNA genômico. O PFGE utilizando a enzima *Not* I além de apresentar um ID de 0,95 e boa reprodutibilidade, possibilitou a análise de todas as cepas testadas, indicando possuir um bom potencial de aplicação em estudos epidemiológicos envolvendo o agente.

7 CONCLUSÕES

- Os sorotipos mais prevalentes nas amostras isoladas são 4, 5 e 14, sendo que mais de 41% das amostras não são sorotipificáveis.
- O poder discriminatório foi maior nos métodos baseados na restrição enzimática do DNA genômico do agente do que no método fenotípico utilizados neste estudo.
- Tanto as técnicas de PFGE quanto de AFLP apresentaram uma boa correlação dos seus resultados com a sorotipagem e a origem das amostras.
- Não foi possível caracterizar todas as cepas testadas através da PFGE empregando a enzima *Sma*I.
- A técnica de PFGE utilizando a enzima de restrição *Not*I possibilitou a caracterização de todas as cepas testadas, apresentou boa reprodutibilidade e um bom índice discriminatório, sendo, portanto uma boa escolha para caracterização do agente.

REFERÊNCIAS

ANGEN, O.; OLIVEIRA, S.; AHRENS, P.; SVENSMARK., B.; LESER, T. D. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. **Veterinary of Microbiology**, v. 119, p. 266–276, 2007.

ANGEN, O.; SVENSMARK, B.; MITTAL, K. R. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. **Veterinary of Microbiology**, v. 103, p. 255-258, 2004.

BAK, H.; RISING, H-J. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. **The Veterinary Record**, v. 151, p. 502-505, 2002.

BAUMANN, G.; BILKEI, G. Effect of vaccinating sows and their piglets on the development of Glasser's disease induced by a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5. **The Veterinary Record**, v. 151, p. 18-21, 2002.

BIBERSTEIN, E. L.; WHITE, D. C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. **Journal Medical Microbiology**, v. 2, p. 75-78, 1969.

BIGAS, A.; GARRIDO, M. E.; BADIOLA, I.; BARBE, J.; LAGOSTERA, M. Colonization capacity and serum bactericidal activity of *Haemophilus parasuis* thy mutants. **International Microbiology**, v. 9, p. 297-301, 2006.

BLACKALL, P. J.; RAPP-GABRIELSON, V. J.; HAMPSON, D. J. Serological Characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, p. 93-95, 1996.

BLACKALL, P. J.; TROTT, D. J.; RAPP-GABRIELSON, V.; HAMPSON, D. J. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. **Veterinary of Microbiology**, v. 103, p. 21-27, 2004.

BLANCO I.; GALINA-PANTOJA, L.; OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C.; SÁNCHEZ, C.; CANALS, A. Comparison between *Haemophilus parasuis* infection in colostrums-

deprived and sow-reared piglets. **Veterinary of Microbiology**, v. 103, p. 21-27, 2004.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 459-453. 1990.

BROCKMEIER, S. L. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. **Veterinary of Microbiology**, v. 99, p. 75-78, 2004.

DE LA PUENTE REDONDO, V. A.; MÉNDEZ, J. N.; GARCÍA DEL BLANCO, N.; BORONAT, N. L.; MARTÍN, C. B. G.; FERRI, E. F. R. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of *tbpA* gene. **Veterinary of Microbiology**, v. 92, p. 253-262, 2003.

DUIM, B.; WASSENAAR, T. M.; RIGTER, A.; WAGENAAR, J. A. High-resolution genotyping of *Campilobacter* strains isolated from poultry and humans whit AFLP fingerprinting. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2369-2375, 1999.

GIROTTTO, A. F. Suínos: análise do desempenho atual. **Anuário 2006 da Suinocultura Industrial**, v. 28, n. 1, p. 16-23, 2006

GUTIERREZ, C. B.; TASCON, R. I.; RODRIGUES BARBOSA, J. I.; GONZALEZ, O. R.; VASQUEZ, J. A.; RODRIGUES FERRI, E. F. Characterization of V factor-dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. **Comparative Immunology Microbiology Infect Diseases** , v. 16, p. 123-130, 1985.

HABU, Y.; FUKUDA-TANAKA; S.; HISATOMI, Y.; LIDA, S. Amplified restricion fragment lengh polimorphhism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. **Biochemintry Biophysic Research Communication**, v. 234, n. 2, p. 516-521, 1997.

HARRIS, D. L.; ROSS, R. F.; SWITZER, W. P. Incidence of certain microorganisms in nasal cavities of swine in Iowa. **American Journal Veterinary Research**, v. 30, p. 1621-1624, 1969.

HEUM, M.; SHAEFER PREGI, R.; KLANAN, D.; CASTAGNA, R.; ACCERBI, M.; BORGHI, B.; SALAMINI, F. Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. **Science**, v. 278, p. 1312-1314, 1997.

HILL, C. E.; METCALF, D. S.; MACINNES, A. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. **Veterinary of Microbiology**, 96, p. 189-202, 2003.

HOEFLING, D. C. Acute myositis associated with *Haemophilus parasuis* in primary SPF sows. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 354-355, 1991.

HOFFMANN, C. R.; BILKEI, G. The effect of a homologous bacterin given to sows pre-farrowing on the development of Glasser's disease in post-weaning pigs after i. v. challenge with *Haemophilus parasuis* serotype 5. **Deutsche-Tierärztliche-Wochenschrift**, v. 109, p. 271-276, 2002.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1903-1905, 1990.

KIELSTEIN, P.; RAPP-GABRIELSON, V. J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-soluble antigen extracts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 862-865, 1992.

KIESTEIN, P.; WUTHE, H.-H.; ANGEN, O.; MUTTERS, R.; AHRENS, P. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. **Veterinary of Microbiology**, v. 81, p. 243-255, 2001.

KIRKWOOD, R. N.; RAWLUK, S. A.; CEGIELSKI, A. C.; OTTO, A. J. Effect of pig age and autogenous sow vaccination on nasal mucosal colonization of pigs by *Haemophilus parasuis*. **Swine Health and Production**, v. 9, p. 77-79, 2001.

LICHTENSTEIGER, C. A.; VIMR, E. R. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 152, p. 269-274, 1997.

LITTLE, T. W. *Haemophilus* infection. **The Veterinary Records**, v. 87, p. 399-402, 1970.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

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**, v. 71, p. 181-188, 2007.

MINIATS, O. P.; SAMRT, N. I.; EWERT, E. Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*. **Canadian Journal Veterinary Research**, 55, p. 33-36, 1991.

MILLAN, A. S.; ESCUDERO, J. A.; CATALAN, A.; NIETO, S.; FARELO, F.; GILBERT, M.; MORENO, M. A.; DOMINGUEZ, L.; GONZALEZ-ZORN, B. β -Lactam Resistance in *Haemophilus parasuis* Is Mediated by Plasmid pB 1000 Bearing bla_{ROB-1}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 51, n. 6, p. 2260-2264, 2007.

MOLLER, K.; ANDERSEN, L. V.; CHRISTENSEN, G.; KILIAN, M. Optimization of the detection of NA; dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. **Veterinary of Microbiology**, v. 36, p. 261-271, 1993.

MOROZUMI, T.; NICOLET, J. Morphological variations of *Haemophilus parasuis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p.138-142, 1986.

MOUSING, J.; LYBYE, H.; BARFOD, K.; MEYLING, A.; RONSHOLT, L.; WILEBERG, P. Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, p. 107-119, 1990.

MULLER, G.; KOHLER, H.; DILLER, R.; RASSBACH, A.; BERNDT, A.; SCHIMMEL, D. Influence of naturally occurring and experimentally induced porcine pneumonia on blood parameters. **Research Veterinary Science**, v. 74, p. 23-30. 2003.

MUNCH, S.; GRUND, S.; KRUGER, M. Fimbriae and membranes of *Haemophilus parasuis*. **Journal Veterinary Medicine**, v. 39, p. 59-64, 1992.

NIELSEN, R. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotype. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 193-198, 1993.

OLIVEIRA, S.; BATISTA, L.; TORREMORELL, M.; PIJOAN, C. Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 161-167, 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 Veterinary Research**, v. 64, p. 435-442, 2003.

OLIVEIRA, S.; GALINA, I.; PIJOAN, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 495-501, 2001.

OLIVEIRA, S.; OLESON T. D.; TITUS, M.; SIMONSON, R. Comparison of *Haemophilus parasuis* genotyping using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and ERIC-PCR. In: MEETING AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 35., 2004, Toronto, Canada. **[Proceedings...]** 2004. p. 273-276, 2004.

OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis epidemiology and control. **Veterinary of Microbiology**, v. 99, p. 1-12, 2004.

OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. The Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 71-75, 2004a.

OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C.; MORRISON, R. Evalidation of *Haemophilus parasuis* control in the nurseys using vaccination and controlled exposure. **Journal Swine Health Production**, v. 12, p. 123-128, 2004.

OLVERA, A.; CALSAMIGLIA, M.; ARAGON, V. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3984-3992, 2006.

OLVERA, A.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; ARAGON, V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. **Microbiology**, v. 152, p. 3683-3689, 2006.

OLVERA, A.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; NOFRORÍAS, 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**, v. 123, p. 230-237, 2007.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. (Ed.). **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 658 p.

RAFIEE, M.; BARA, M.; STEPHENS C. P.; BLACKALL, P. J. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 846-849, 2000.

RAFIEE, M.; BLACKALL, P. J. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 172-174, 2000.

RAPP-GABRIELSON, V. J. *Haemophilus parasuis*. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Disease of swine**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2000. p. 475-481.

RAPP-GRABIELSON, V. J.; GABRIELSON, D. A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovar among isolates from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 659-664, 1992.

RAPP- GRABIELSON, 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**, v. 53, p. 987-994, 1992.

RAPP-GABRIELSON, V. J.; KOCUR, G. J.; CLARK, J. T.; MUIR, S. K. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination. **Veterinary Medicine**, v. 92, p. 83-90, 1997.

RÚBIES, X.; KIELSTEIN, P.; COSTA, LI.; RIERA, P.; ARTIGAS, C.; ESPUÑA, E. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. **Veterinary of Microbiology**, v. 66, p. 245-248, 1999.

RUIZ, A.; OLIVEIRA, S.; TORREMORELL, M.; PIJOAN, C. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1757-1762, 2001.

SAN MILLAN, A.; ESCUDERO, J. A.; CATALAN, A.; NIETO, S.; FARELO, F.; GILBERT, M.; MORENO, M. A.; DOMINGUEZ, L.; GONZALES-ZORN, B. β -Lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing bla_{rob}-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2260-2264, 2007.

SANTOS, J. L.; LEITE, R. C.; ABREU, V. L. V.; BRITO, M. A. V. P.; HADDAD, J. P. A. Frequência de sorovares de *Haemophilus parasuis* no Brasil. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 8., 1997, Foz do Iguaçu, Paraná. **Anais...** 1997. p. 183-184.

SCHWARTZ, H.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed Field gradient gel electrophoresis. **Cellular**, v. 37, p. 67-75, 1984.

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 Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 236-243, 1997.

SMART, N. L.; HURNIK, D.; MACILNESS, J. I. An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **Canadian of Veterinary Journal**, v. 34, p. 487-490, 1993.

SMART, N. L.; MINIATS, O. P. Preliminary Assessment of a *Haemophilus parasuis* Bacterin for use in specific pathogen free swine. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 3990-3993, 1989.

SMART, N. I.; MINIATS, O.P.; MACINESS, J. I. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 319-324, 1988.

SMART, N. L.; MINIATS, O. P.; ROSENDAL, S.; FRIENDSHIP, R. Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario. **Canadian of Journal Veterinary Research**, v. 30, p. 339-343, 1989.

SOBESTIANSKY, J.; DE BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; DE OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. Doença de glässer. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: A3 Impressos Especiais, 1999. p. 119-122.

SOLANO AGUILAR, G. I.; PIJOAN, C.; RAPP-GABRIELSON, V.; COLLINS, J.; CARVALHO, L. F.; WINKELMAN, N. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 81-87, 1999

SOLANO , G. I.; SEGALLES, J.; COLLINS, J. E.; MOLITOR, T. W.; PIJOAN, C. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSv) interaction with *Haemophilus parasuis*. **Veterinary of Microbiology**, v. 55, p. 247-257, 1997.

STRUELENS, M. J.; DE RYCK, R.; DEPLANO, A. Analysis of Microbial Genomic Macrorestriction Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing data. In: DIJKSHOORN, L.; TOWER K. J.; STRUELENS, M. **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. London: Elsevier, 2001. p. 159-176.

TADJINE, M.; MITTAL, K. R.; BOURDON, S.; GOTTSCHALK, M. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in north America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 839-840, 2004.

TADJINE, M.; MITTAL, K. R.; BOURDON, S.; GOTTSCHALK, M. Production e characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. **Microbiology**, v. 150, p. 3935-3945, 2004a.

TAKAHASHI, K.; NAGA, S.; YAGIHASHI, T.; IKEATA, T.; NAKANO, Y.; SENNA, K.; MARUYAMA, Y.; MUROFUSHI, J. A cross-protection experiment in pigs vaccinatd with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evalidation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. **Journal Veterinary Medicine Science**, 63, p. 487-491, 2001.

VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. Experimental reproduction *Haemophilus parasuis* infection in swine: Clinical, bacteriological, and morphologic findings. **Journal Veterinary Diagnostic Investigaton**, v. 7, p. 746-780, 1995.

VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. Iteration of *Haemophilus parsuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrums deprived (CDCD) swine. **Candian Journal Veterinary Research**, v. 61, p. 200-206, 1997.