

José Lúcio dos Santos

**EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA INFECCÃO POR
*HAEMOPHILUS PARASUIS***

Tese apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina
Veterinária Preventiva e Epidemiologia
Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira
Leite

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1997

S237e Santos, José Lúcio dos, 1952 -

Epidemiologia e controle da
infecção por *Haemophilus parasuis* /
José Lúcio dos Santos. - Belo
Horizonte: UFMG - Escola de
Veterinária, 1997.

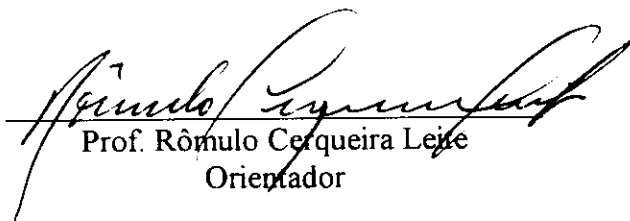
139p. : il.

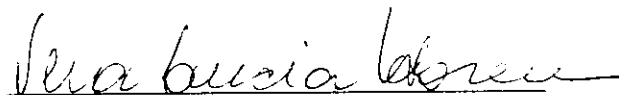
Tese (doutorado)

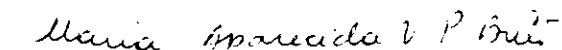
1. Suíno - Doenças - Controle -
Teses. 2. Doença por *Haemophilus* -
Epidemiologia - Teses. 3. Doença por
Haemophilus - Vacina - Teses. 4.
Haemophilus - Identificação - Teses.
I. Título.

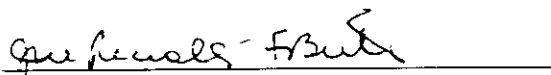
CDD - 636.408.969 2

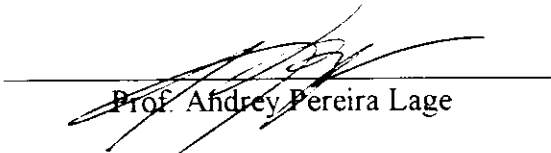
Tese defendida e aprovada em 18 de julho de 1997, pela Comissão
Examinadora constituída por:


Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Orientador


Prof.ª Vera Lúcia Viegas de Abreu


Dra. Maria Aparecida V. P. Brito


Dr. José Reinaldi Feitosa Brito


Prof. Andrey Pereira Lage

*À Maria pelo: amor, trabalho árduo,
companheirismo, amizade, ilusões,
esperanças, desilusões, cobranças,
alegria de viver uma vida que todo
dia recomeça como se fosse o
primeiro dia da sua existência*

*Aos Meus pais, Manoel Pedro e
Maria do Carmo pelo exemplo de
vida,*

*Aos meus filhos Daniel, Victor e
Lucas a quem espero deixar o legado
de trabalho, honestidade e seriedade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pela amizade, exemplo de vida, dedicação, honestidade, trabalho, equilíbrio, incentivo, por ter me aceito como orientado.

À Professora Vera Lúcia Viegas Abreu pelo incentivo, ajuda e sugestões na elaboração deste trabalho.

À Dra. Maria Aparecida Brito pela ajuda e sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Andrey pela ajuda, incentivo e sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao Departamento de Veterinária e a Universidade Federal de Viçosa por permitir este treinamento.

À FINEP pelo financiamento do projeto de Pesquisa.

À CAPES pela ajuda financeira.

À Microvet e seus funcionários pela colaboração em diversos testes e pelas amostras cedidas.

À Agroceres pelos animais fornecidos para os experimentos.

À todas as granjas que facilitaram a coleta de material em suínos.

Aos Colegas veterinários por suas valiosas informações.

À Nádia pelo auxílio na correção e elaboração do texto final da tese

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	15
Capítulo 1 INTRODUÇÃO	17
Capítulo 2 FREQUÊNCIA DE SOROVARES DE <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i> NO BRASIL	21
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
2.4 CONCLUSÕES	43
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
Capítulo 3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i> EM GRANJAS DE MANEJO CONVENCIONAL NO BRASIL	51
3.1 INTRODUÇÃO	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.4 CONCLUSÕES	67
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
Capítulo 4 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA MONOVALENTE DE <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i>	73
4.1 INTRODUÇÃO	75

4.2	MATERIAL E MÉTODOS	78
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.4	CONCLUSÕES	93
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
Capítulo 5	PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA TRIVALENTE DE <i>HAEMOPHILUS PARASUIS</i>	101
5.1	INTRODUÇÃO	103
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	105
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
5.4	CONCLUSÕES	121
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
Capítulo 6	DISCUSSÃO GERAL	129
	SUMMARY	135
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

LISTA DE TABELAS

		Pag.
Capítulo 2	Frequência de sorovares de <i>Haemophilus. Parasuis</i> no Brasil	21
TABELA 1	Isolamento de <i>H. parasuis</i> por propriedade e Estado de origem. Brasil, 1995-96	31
TABELA 2	Frequência de sorovares de <i>H. parasuis</i> isolados no Brasil. 1995-96	32
TABELA 3	Distribuição dos sorovares de <i>H. parasuis</i> nos Estados estudados. Brasil. 1995-96	35
TABELA 4	Distribuição dos sorovares de <i>H. parasuis</i> segundo a faixa etária. Brasil. 1995-96	37
TABELA 5	Distribuição dos sorovares de <i>H. parasuis</i> segundo os espécimes clínicos onde ocorreu o isolamento. Brasil. 1995-96	38
TABELA 6	Frequência de sorovares de <i>H. parasuis</i> em suínos sadios e doentes. Brasil. 1995-96	40
TABELA 7	Distribuição de sorovares de <i>H. parasuis</i> segundo os meses do ano. Brasil. 1995-96	41
TABELA 8	Número de sorovares de <i>H. parasuis</i> isolados por propriedade. Brasil. 1995-96	42
Capítulo 3	Aspectos epidemiológicos da infecção por <i>Haemophilus parasuis</i> em granjas de manejo convencional no Brasil.	51
TABELA 1	Isolamento de amostras de <i>H. parasuis</i> segundo os Estados. Brasil. 1995-96	58
TABELA 2	Distribuição do isolamento de <i>H. parasuis</i> segundo as faixas etárias dos suínos. Brasil. 1995-96	60

TABELA 3	Isolamento de <i>H. parasuis</i> de acordo com as estações do ano. Brasil, 1995-96	62
TABELA 4	Isolamento de <i>H. parasuis</i> segundo os meses do ano. Brasil, 1995-96	62
TABELA 5	Isolamento de <i>H. parasuis</i> por espécimes clínicos. Brasil, 1995-96	63
TABELA 6	Agentes bacterianos isolados em suínos simultaneamente com <i>H. parasuis</i> . Brasil, 1995-96	65
Capítulo 4	Produção e avaliação de uma bacterina monovalente de <i>Haemophilus parasuis</i>	73
TABELA 1	Concentração bacteriana do inóculo, tempo para a morte, lesões e isolamento após passagens em série em suínos utilizados na ativação da virulência do sorovar 5 de <i>H. parasuis</i> .	82
TABELA 2	Peso e ganho de peso diário dos suínos dos grupos vacinados e não vacinados aos 21, 64, 118 e 144 dias de idade.	85
TABELA 3	Sintomas clínicos observados em suínos vacinados com bacterina de <i>H. parasuis</i> sorovar 5.	86
TABELA 4	Suínos mortos e sobreviventes entre os vacinados e não vacinados inoculados com <i>H. parasuis</i> sorovar 5	88
TABELA 5	Número de animais mortos e frequência acumulada em horas pós-inoculação de suínos não vacinados e inoculados com <i>H. parasuis</i> sorovar 5.	89
TABELA 6	Número médio de colônias isoladas de espécimes clínicos de suínos não vacinados, mortos, após desafio com <i>H. parasuis</i> sorovar 5.	91

Capítulo 5	Produção e avaliação de uma bacterina trivalente de <i>Haemophilus parasuis</i>	101
TABELA 1	Concentração bacteriana dos inóculos, tempo para a morte, após cinco passagens em série, em suínos utilizados na 'ativação' da virulência dos sorovares 1, 4 e 6 de <i>H. parasuis</i> .	110
TABELA 2	Agentes bacterianos isolados a partir de secreções nasais aos 36, 56 e 73 dias de idade, de suínos utilizados na avaliação da bacterina trivalente de <i>H. parasuis</i> .	113
TABELA 3	Peso médio dos suínos vacinados com bacterina trivalente de <i>H. parasuis</i> e desafiados com sorovares 1, 5 e 6.	114
TABELA 4	Número de suínos que apresentaram reações a vacinação com bacterina trivalente de <i>H. parasuis</i> .	114
TABELA 5	Mortalidade de suínos vacinados ou não com bacterina trivalente e desafiados com <i>H. parasuis</i> sorovares 1, 5 e 6.	117
TABELA 6	Número médio de colônias de <i>H. parasuis</i> isoladas dos suínos não vacinados e mortos pelo desafio com sorovares 1, 5 e 6.	117

RESUMO

No presente trabalho foram estudados aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus parasuis* isolados de animais com e sem sintomatologia clínica de 204 suinoculturas, de manejo tradicional, com mais de 50 matrizes, nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Bahia. Nos meses de julho, agosto e setembro foi observada maior frequência de infecções por *H. parasuis*. A faixa etária mais atingida foi a de 70 a 100 dias de idade. O pulmão, a traquéia e o focinho foram os espécimes clínicos de eleição para exames laboratoriais. Estudou-se a frequência dos sorovares de *H. parasuis* em 321 amostras isoladas de 204 suinoculturas, observando pela primeira vez no Brasil e na América Latina a presença de todos os 15 sorovares, sendo os de número 1, 4, 5 e 12 os mais frequentes, representando 47,4% das amostras examinadas. Em 59 (28,9%) suinoculturas havia mais de um sorovar, em algumas foram detectadas seis ou sete sorovares, sendo mais frequentes 1, 4, 9 e 12. Produziu-se e avaliou uma bacterina monovalente de *H. parasuis* sorovar 5 que protegeu todos os 32 suínos de 65 dias de idade contra o desafio homólogo com quatro mL contendo $2,5 \times 10^9$ UFC/mL, enquanto 31 dos 32 não-vacinados morreram. Produziu-se, ainda, uma bacterina trivalente com os sorovares 1, 4 e 5 de *H. parasuis* e avaliou a sua proteção em três grupos (C, D e E) de 17 leitões cada, sendo 14 vacinados e três que permaneceram como controle não-vacinado. Aos 73 dias de idade cada grupo foi desafiado com quatro mL por via intratraqueal de 10^9 UFC/mL dos sorovares 1, 5 e 6, respectivamente. Todos os 14 animais vacinados de cada grupo resistiram ao desafio, enquanto os três animais não-

vacinados de cada grupo morreram dois dias após o desafio, com lesões típicas da doença de Glässer.

Palavras-chave: Suíno, *Haemophilus parasuis*, sorovares, bacterina monovalente, bacterina trivalente.

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

A suinocultura tem apresentado ao longo dos últimos anos um desenvolvimento técnico muito grande, o que tem induzido mudanças radicais nas técnicas de manejo, na nutrição, na genética e na sanidade. Assim, a sanidade passa por uma verdadeira revolução em termos de importância das doenças, pois aquelas conhecidas e classificadas como de maior gravidade e importância econômica passaram rapidamente para doenças em fase de controle ou até mesmo de erradicação, como a peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose suína, pneumonia enzoótica, leptospirose e rinite atrófica dentre outras. Isto se deve a novas técnicas de manejo, como o desmame precoce segregado, a produção em três ou múltiplos sítios, as vacinas novas e mais eficientes e rações que permitem o desmame com até cinco dias de idade. Estas melhorias vêm ocorrendo, principalmente, nas suinoculturas americana e européia, a partir de 1989. As facilidades de comunicação e transporte existentes propiciaram aos técnicos e criadores brasileiros o acesso a estas informações e a adoção destas medidas em nossa suinocultura. Por outro lado, este conjunto de técnicas novas tem também desvantagens, pois os animais submetidos ao desmame precoce segregado e criados em sítios múltiplos, portanto de alto padrão sanitário, possuem baixo nível de imunidade e, conseqüentemente, são altamente sensíveis a agentes até então considerados de baixa ou nenhuma patogenicidade, como *Haemophilus parasuis*, agente causador da doença de Glässer. *H. parasuis* é um dos poucos agentes que não são eliminados pela

técnica de desmame segregado, o que, sem dúvida, aumenta a sua importância nestas produções.

Em plantéis de baixo padrão sanitário, nos últimos anos, com o uso conjunto de medicação estratégica e vacinas contra rinite atrófica progressiva, pneumonia micoplásmica e pleuropneumonia suína, obteve-se o controle das principais doenças de importância econômica. Agentes infecciosos considerados de baixa patogenicidade, como o *H. parasuis*, assumiram lugar de destaque entre os causadores de doenças consideradas como importantes na suinocultura atual. Recentes surtos na Europa e América do Norte confirmam e destacam *H. parasuis* como um patógeno de importância econômica emergente na suinocultura mundial.

H. parasuis é frequentemente isolado da cavidade nasal e do pulmão de suínos doentes e também daqueles aparentemente saudáveis, mas a prevalência pode ser subestimada pela dificuldade da técnica de isolamento. São conhecidos 15 sorovares de *H. parasuis*, e a vacinação é considerada um método eficiente no controle do sorovar homólogo.

Como a tecnologia de produção de suínos adotada em parte dos plantéis brasileiros é semelhante àquela utilizada nos países de suinocultura mais desenvolvida, os problemas também passam a ser semelhantes. Deste modo, a doença de Glässer apresenta-se de forma crescente no Brasil, e surtos graves em granjas onde se suspeita do envolvimento deste agente têm sido relatados por técnicos em nível de campo. Entretanto, os poucos estudos realizados sobre este agente no Brasil são limitados e não abordam a prevalência do agente, os sorovares mais frequentes e as medidas de controle. O País não dispõe de vacinas e nada se sabe sobre a eficiência destas na proteção homóloga e heteróloga. Enfim, a suinocultura brasileira não está preparada para conviver com o *H. parasuis* e a doença de Glässer.

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) Estudar alguns aspectos da epidemiologia da infecção pelo *H. parasuis*.
- b) Determinar a frequência dos diversos sorovares de *H. parasuis* presentes na suinocultura brasileira.
- c) Produzir e avaliar bacterinas mono e trivalente para o controle da doença de Glässer

CAPITULO 2

FREQÜÊNCIA DE *HAEMOPHILUS PARASUIS* NO BRASIL

FREQÜÊNCIA DE SOROVARES DE *HAEMOPHILUS PARASUIS* NO BRASIL

2.1 INTRODUÇÃO

A polisserosite e artrite causadas por *Haemophilus parasuis* caracterizam uma síndrome denominada doença de Glässer. Trata-se de uma doença infecto-contagiosa, cujas lesões primárias caracterizam-se por artrite, peritonite, pleurite, pericardite fibrinosa e meningite. A doença tem sido considerada esporádica e associada ao estresse em animais jovens, principalmente de creche (Nicolet, 1992). Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas para criações de rebanhos livres de patógenos específicos (SPF) (Barber et al., 1955; Whittlestone & Betts, 1955), ou rebanhos de "doença mínima" (Alexander et al., 1980), ou, mais recentemente, com o sistema de desmama precoce e a criação em dois ou três sítios diferentes (Harris, 1988) e a desmama precoce segregada (Connor, 1990; Dritz et al., 1996), estes rebanhos passam a representar populações com imunidade baixa ou ausente. Com a melhoria do controle das doenças respiratórias, como pneumonia enzoótica, pleuropneumonia suína e rinite atrófica progressiva pelo uso de vacinas novas ou melhoradas (Dayalu & Ross, 1990; van den Bosch et al., 1990; Nielsen, et al., 1990), associadas a esquemas medicamentosos estratégicos, houve forte redução no número dos agentes bacterianos patogênicos que colonizam o trato respiratório dos suínos, diminuindo a competição com outros agentes. Em consequência, *H. parasuis* e outras bactérias de pouca importância nas patologias respiratórias aumentaram suas participações na flora do trato respiratório. Com a introdução na granja de suínos de reposição portadores de *H. parasuis*, ou com a mistura de animais

de diversas origens pode ocorrer a exposição de animais com imunidade baixa ou ausente para este agente infeccioso. Nesta situação, as infecções causadas por *H. parasuis* têm apresentado comportamento caracterizado por surtos epidêmicos com altas morbidade e mortalidade, atingindo todas as idades, e na ausência de fatores estressantes (Nielsen & Danielsen, 1975; Nielsen, 1980; Madsen, 1984; Miniats et al., 1986; Smart et al., 1993; Budde & Olson, 1995).

A sorotipagem das amostras de *H. parasuis* assumiu posição de destaque a partir dos trabalhos de Morozumi & Nicolet (1986) e Nicolet et al. (1986). Estes autores, por meio da imunodifusão dupla em ágar gel com antígeno polissacáride termo estável, associado à cápsula ou membrana externa, classificaram sete sorovares, nomeados de 1 a 7. Esta técnica foi adotada como padrão para as classificações de *H. parasuis*. A classificação sorológica de *H. parasuis* iniciou-se com Bakos (1952), que descreveu os sorovares de A a D, baseando em testes de precipitação conduzidos em 120 amostras de *H. parasuis*. Schimmel et al. (1985), usando o teste de aglutinação, classificaram três novos sorovares ao estudarem 115 amostras. Smart et al. (1988) analisaram o 'fingerprinting' do DNA usando restrição de endonuclease em 69 amostras de *H. parasuis* e estabeleceram o perfil de 13 padrões distintos, que não se relacionaram com os sorotipos definidos por imunodifusão. Kielstein et al. (1991) examinaram por imunodifusão 158 amostras de *H. parasuis* isoladas em 17 propriedades da Alemanha Oriental e reportaram a existência de sete novos sorovares, designados de Jena 6 a Jena 12, sendo os sorovares 5, 4 e 2 foram os mais freqüentes. Ao examinarem por imunodifusão em ágar gel 243 amostras isoladas na América do Norte, Austrália e Brasil, Rapp-Gabrielson & Gabrielson (1992) relataram a existência de cinco novos sorovares, que foram designados de ND1 a ND5 e uma prevalência dos sorovares 4, 5, 13 e 14. Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) compararam os diversos sorovares identificados e descritos por Bakos (1955), Schimmel et

al. (1985), Morozumi & Nicolet (1986), Kielstein et al. (1991) e Rapp-Gabrielson e Gabrielson (1992) e propuseram a classificação de 1 a 15 para os sorovares de *H. parasuis*. Observaram ainda que os sorovares 4 e 5 foram os mais prevalentes nas 290 amostras isoladas em 20 propriedades da Alemanha Oriental. Recentemente Blackall et al. (1996) observaram em 31 amostras de *H. parasuis* isoladas na Austrália maior ocorrência dos sorovares 5 e 13, seguida por amostras não-sorotipáveis.

Tem sido relatada, em diversos trabalhos, uma associação entre virulência e sorovar de *H. parasuis*. Assim, Rapp-Gabrielson et al. (1992) observaram que em *Cavia porcellus* os sorovares 1 e 5 foram mais invasivos, causando doença ou morte em altas doses de desafio e septicemia persistente em baixas doses, quando comparados aos sorovares 2 e 6, que produziram broncopneumonia e morte em alguns animais, e aos sorovares 3, 4 e 7, que produziam sinais clínicos transitórios e a mínima evidência de infecção à necropsia. Rosner et al. (1991) observaram que os sorovares 1, 5, 10 e 12 foram de alta virulência para suínos SPF, os 2 e 4 de média virulência e os demais de baixa virulência. Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) determinaram a virulência dos sorovares de *H. parasuis* em suínos SPF e observaram que os sorovares 1, 5, 10, 12, 13 e 14 foram os mais virulentos, e os de média virulência foram os sorovares 2, 4 e 15. O sorovar 8 apresentou baixa virulência, e os sorovares 3, 6, 7, 9 e 11 foram não-virulentos. Nielsen (1993) estudou a virulência dos sorovares 1 a 7 pela inoculação intranasal em suínos SPF e observou que somente os sorovares 1 e 5 produziram lesões típicas da doença de Glässer

O segmento tecnificado da suinocultura brasileira encontra-se em uma situação peculiar em relação ao *H. parasuis*. Devido às dificuldades relacionadas a seu isolamento (Nicolet, 1992) e de poucos laboratórios estarem aptos ao seu manuseio, existem poucos relatos sobre *H. parasuis* e doença de Glässer nas publicações brasileiras. Sobestiansky et al. (1988) alertaram sobre o

desconhecimento da doença no Brasil e descreveram um surto em propriedade com 15 porcas. Álvares (1991) realizou um estudo de reprodução experimental da doença de Glässer em leitões oriundos de rebanho formado a partir da desmama precoce. Brito et al. (1994) isolaram 17 amostras de *H. parasuis*, sendo 10 de animais doentes, cinco classificadas como pertencentes aos sorovares 2, 4, 7, 13 e uma não-tipável. Barbosa (1996) relatou, recentemente, o isolamento de 197 (22,1%) amostras de *H. parasuis* em 890 exames laboratoriais positivos para a presença de patógenos bacterianos respiratórios de suínos, de granjas tecnificadas do Estado de Minas Gerais, mas não submeteu estas amostras à classificação sorológica.

A suinocultura brasileira está se modernizando rapidamente e adotando práticas de manejo semelhantes às modernas criações da Europa e América do Norte. Neste quadro espera-se que os problemas sejam semelhantes, e dentro desta ótica, a doença de Glässer pode vir a constituir uma ameaça às nossas produções. *H. parasuis* está presente na suinocultura brasileira, mas pouco se sabe sobre a sua participação nas patologias suínas e, em especial, sobre a frequência dos diversos sorovares.

O objetivo do presente trabalho foi classificar sorologicamente as amostras isoladas de *H. parasuis* e determinar a frequência dos diversos sorovares de *H. parasuis* na suinocultura do Brasil.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras foram coletados em granjas comerciais, de ciclo completo, com mais de 50 matrizes, com manejo convencional e sistema 'todos dentro, todos fora', nas fases de maternidade e creche, das principais regiões produtoras de suínos nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Foi também utilizado material de demanda de diagnóstico da doença de Glässer dos estados já mencionados e de Goiás, Paraná, Bahia e Mato Grosso durante os anos de 1995 e 1996. Os materiais foram processados no Laboratório do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Viçosa e no Laboratório Microvet¹, que cedeu as amostras isoladas para este trabalho. Animais com idade entre um e 180 dias apresentando sintomatologia de doença respiratória e encefalite, compatíveis com a Doença de Glässer, foram sacrificados na própria granja e coletados espécimes clínicos do pulmão, focinho, cérebro e da traquéia. Estes materiais foram acondicionados em sacos plásticos e transportados ao laboratório, sob refrigeração, em até 24h. Nas granjas onde não se observou a presença de animais doentes foram coletadas dez zaragatoas nasais de suínos entre 60 e 100 dias de idade, em diferentes baias (Smart et. al., 1989).

Para estudar a frequência dos sorovares de *H. parasuis* na suinocultura brasileira estimou-se, com base em experiências de campo, que 50% das granjas eram positivas para *H. parasuis* e

¹ Microvet Microbiologia Veterinaria Especial Ltda, Viçosa - MG, Brasil

definiu o universo a ser estudado em 1.000 granjas positivas. Silva (1997) registrou a existência, em Minas Gerais, de 402 granjas com mais de 50 matrizes e 201 com mais de 100 matrizes. Foi calculada uma amostra para uma frequência esperada de 2%, com um nível de confiança de 95% para qualquer um dos 15 sorovares de referência serem identificados em uma propriedade, independentemente da presença de qualquer outro sorovar na mesma propriedade. Foi utilizada a fórmula (Martin, et al., 1988) a seguir:

$$n = [1 - (1 - \alpha)^{1/D}] [N - (D - 1)/2].$$

Os valores aplicados na fórmula foram:

N = 1.000 granjas;

D = 20 granjas (número mínimo de positivos para um sorovar específico); e

α = nível de confiança = 95%.

Foi utilizado o valor de 20 granjas para D, devido à frequência mínima esperada de 2% por sorovar. O valor calculado foi de 138 granjas a serem amostradas. Em razão da pouca informação sobre o assunto, adotou-se uma postura conservadora no cálculo da amostra, havendo um acréscimo em torno de 50% no valor calculado ($n=204$).

Foram coletadas 210 amostras em 115 propriedades nos diversos estados estudados. As 111 amostras de demanda tiveram origem em 89 propriedades, das quais 29, de 26 propriedades, constituíram a demanda do Laboratório de Medicina Preventiva da Universidade Federal de Viçosa. As outras 82 amostras de demanda de 63 propriedades foram cedidas pelo Laboratório Microvet.

Para o isolamento e a identificação do *H. parasuis* foram considerados os aspectos de morfologia, coloração pelo método de Gram, hemólise em ágar sangue base² de carneiro, teste de satelitismo ao *Staphylococcus aureus*, teste de CAMP e utilização da arabinose, glicose, lactose, manitol e rafinose (Møller & Kilian,

² Difco Laboratories. Detroit - MI. EUA

1990 e Gutierrez et al., 1993). Após o isolamento, todas as amostras foram liofilizadas até, no máximo, a terceira passagem '*in vitro*'.

Amostras de Referência

Para a produção do anti-soro foram utilizadas as amostras de referência dos sorovares 1 (nº 4), 2 (SW 410), 3 (SW 411), 4 (SW 124), 5 (Nagasaki), 6 (H 425), 7 (H 643), 8 (C 5), 9 (D 74), 10 (H 555), 11 (H 465), 12 (H 425), 13 (84.17975), 14 (84. 22113) e 15 (H 790) de *H. parasuis* recebidas do pesquisador P. Kielstein (Research Institute for Bacterial Animal Diseases- Jena- Germany) e citado por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992).

Produção do anti-soro

Produção do Inóculo

Os sorovares de referência foram inoculados em ágar PPLO² S (suplementado com 5% de soro de coelho, 0,004% de NAD³ - β nicotinamida adenina dinucleotídeo) e incubados por 16h, a 37°C, em jarra com ambiente de 5% de CO₂, conseguido com a chama de vela. O crescimento bacteriano foi coletado em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2, e centrifugado a 8.000 x g por 20min, a 4°C. O sedimento foi lavado uma vez e suspenso em PBS pH 7,2 contendo 0,3% de formalina. A concentração final foi padronizada em 10¹⁰ UFC/mL pela comparação visual com o tubo 10 da escala de MacFarland.

Três tipos de antígenos foram preparados para inoculação em coelho. O primeiro foi na proporção de 8:2 com adjuvante oleoso, o segundo consistiu do antígeno morto (0,3% de formalina) e o terceiro, antígeno vivo.

³ Sigma Chemical Company, St. Louis - MO, EUA

Inoculação em Coelhos

Os coelhos foram inoculados por via intramuscular, no membro posterior, com o antígeno com adjuvante oleoso, segundo o seguinte esquema: dia zero, 2,0 mL; dia 14, 1,0 mL e dia 27, 2,0 mL. Em seguida, os coelhos foram submetidos a uma série de seis inoculações intravenosas de 0,5 mL, com intervalos de quatro dias, sendo as três primeiras com antígeno morto e as três últimas com antígeno vivo, ambos padronizados em 10^{10} UFC/mL. Dez dias após a última inoculação, foi coletada uma amostra de soro para determinação, por imunodifusão dupla, do título de anticorpos por sorovar, que, em todos os casos, foi =1:32. Quatorze dias após a última inoculação, os coelhos foram sangrados, e o soro estocado a -20°C até o momento do uso.

Sorologia

Para a produção do antígeno, as 321 amostras isoladas de campo foram cultivadas separadamente em ágar PPLO S por 16h, a 37°C , em jarra com ambientes de 5% de CO_2 . A massa bacteriana foi coletada em salina e autoclavada por 2h, a 121°C . A classificação sorológica das amostras foi realizada por meio do teste de imunodifusão dupla em ágar gel (IDAG), segundo metodologia utilizada por Morozumi & Nicolet (1986).

Após a classificação sorológica, analisou-se a frequência dos sorovares em relação ao estado de origem, a faixa etária, espécie e estado clínico, o mês e as propriedades com mais de um sorovar.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos isolamentos de *H. parasuis* e o número de propriedades estudadas por Estados são apresentados na Tabela 1. O maior número de amostras de Minas Gerais deve-se ao fato de estar estabelecida no Estado uma suinocultura caracterizada por uma atividade empresarial autônoma, em que os resultados econômicos são perseguidos com tenacidade e todos os fatores que podem interferir na produtividade são estudados, visando uma solução e manter a competitividade com outras regiões produtoras de suínos do País.

Tabela 1. Isolamento de *H. parasuis* por propriedade e estado de origem. Brasil. 1995-96.

Estados	Propriedades		Isolamentos	
	Número	%	Número	%
BA	1	0,5	1	0,3
ES	14	6,9	17	5,3
GO	3	1,5	8	2,5
MG	129	63,2	211	65,7
MT	1	0,5	1	0,3
PR	8	3,9	11	3,5
RJ	12	5,9	17	5,3
SP	36	17,6	55	17,1
Total	204	100,0	321	100,0

A frequência dos sorovares de *H. parasuis* no Brasil, obtida por meio de classificação sorológica pela IDAG, consta na Tabela 2.

Tabela 2. Frequência de sorovares de *H. parasuis* isolados no Brasil, 1995-96.

Sorovares	Isolamento(s)	
	Número(s)	Frequência
1	45	14,0
2	11	3,4
3	9	2,8
4	39	12,2
5	32	10,0
6	12	3,7
7	23	7,2
8	8	2,5
9	20	6,2
10	24	7,5
11	16	5,0
12	36	11,2
13	6	1,9
14	9	2,8
15	3	0,9
NS*	28	8,7
Total	321	100,0

* NS = não sorotipável

As maiores frequências foram verificadas para os sorovares 1, 4, 5 e 12, representando 47,4% do total das amostras analisadas. A maior participação do sorovar 1 pode ter origem em possível disseminação a partir de animais de reposição, portadores do sorovar específico. Em geral, as propriedades possuíam suinoculturas tecnificadas que se caracterizaram por aquisição de animais diretamente das empresas de melhoramento genético de suínos, não havendo compra ou troca de animais entre os produtores comerciais. Estas granjas, de ciclo completo, mantinham bom programa de biossegurança e eram assistidas por veterinários. Kielstein et al. (1991) observaram em 150 amostras de *H. parasuis*, oriundas de 17 propriedades da

Alemanha Oriental, maior frequência dos sorovares 2, 4 e 5 contrastando com os presentes resultados, que tiveram origem em 204 propriedades. Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992) observaram os sorovares 5 (23,8%), 4 (17,2%) e 2 (5,5%) como os mais prevalentes em 290 amostras de *H. parasuis* de 20 propriedades na Alemanha Oriental. A prevalência em Canadá e EUA observada em 108 e 120 amostras, respectivamente, por Rapp-Gabrielson & Gabrielson (1992) apresentou o sorovar 5 como o mais prevalente, com 35,2% e 12,5% para cada país. As outras prevalências dos sorovares observados por Rapp-Gabrielson & Gabrielson (1992) foram 12,5% para o sorovar 14, 10,8% para o sorovar 2 e 10,8% para o sorovar 12, nos EUA, e no Canadá 5,6%, 4,6% e 2,8% para cada sorovar, respectivamente. Vinte e oito amostras não sorotipadas isoladas no presente estudo representaram 8,7% do total, que é um resultado menor do que aqueles obtidos por Kielstein et al. (1991), Rapp-Gabrielson & Gabrielson (1992) e Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) que foram, respectivamente, 27,1%, 15,2% e 26,2%. O percentual acima de amostras não sorotipadas deve-se, possivelmente, às poucas passagens '*in vitro*' e ao alto percentual (90,7%) de amostras obtidas de animais doentes (Tab. 6).

Os sorovares 1, 5, 10 e 12, considerados virulentos (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992), foram observados em 137 (42,7%) amostras, o sorovar 4, de média virulência, em 39 (12,2%), e os de sorovares 7 e 9, avirulentos, em 43 (13,4%). É importante chamar a atenção para a participação expressiva dos sorovares 1 e 10, com 69 (21,5%) amostras, o que não foi relatado por Rapp-Gabrielson & Gabrielson (1992) e Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992). A baixa prevalência dos sorovares 13 e 14 foi observada também por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992), mas Blackall et al. (1996) observaram em 31 amostras de *H. parasuis* sorotipadas na Austrália que o sorovar 5 com sete (22,8%), foi o mais freqüente, seguido do sorovar 13, em seis (19,3%) amostras. A presença do sorovar 8 em 2,5% das amostras examinadas demonstra a particularidade da

distribuição nas amostras estudadas no Brasil. A distribuição dos sorovares de *H. parasuis* segundo os estados consta na Tabela 3. Como pode ser observado nos resultados, em Minas Gerais detectou-se a presença de todos os 15 sorovares de *H. parasuis*, enquanto em São Paulo verificou todos os sorovares, exceto 3, 8 e 14, em uma amostragem realizada em 36 propriedades, com o isolamento de 55 amostras. Os sorovares 3 e 8 são considerados de baixa virulência (Kielstein & Rapp-Gabrielsen, 1992) e, possivelmente, por não causar doença clínica, os animais portadores não foram selecionados na amostragem.

Tabela 3. Distribuição dos sorovares de *H. parasuis* nos estados estudados. Brasil, 1995-96

Sorovares	Estados								Total
	BA	ES	GO	MG	MT	PR	RJ	SP	
1		3	2	28		1	3	8	45
2				7		2		2	11
3				8		1			9
4		4	3	20		3	2	7	39
5	1	2		20		1	1	7	32
6		1	1	6			1	3	12
7			2	13			1	7	23
8				5	1		2		8
9		1		17				2	20
10		1		15			2	6	24
11				14		1		1	16
12		4		21		1	3	7	36
13				5				1	6
14				9					9
15		1		1				2	4
NS				22		1	2	2	27
Total	1	17	8	211	1	11	17	55	321

Nos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Goiás e até mesmo São Paulo, a suinocultura possui algumas peculiaridades de manejo e comercialização, incluindo-se a compra de reprodutores em diversas granjas e um sistema de produção em que produz leitões em um sítio e termina o ciclo em outros sítios, o que leva, muitas vezes, à mistura de animais de fontes diferentes, facilitando a difusão dos vários sorovares de *H. parasuis*. Este sistema de produção não está implantado em Minas Gerais, onde as granjas são fechadas, de ciclo completo e a maioria com introdução de animais de reposição de origem única. A análise da distribuição dos sorovares nos estados estudados (Tab. 3), exceto Minas Gerais,

indica a presença de todos os sorovares, com exceção do 14, apesar do pequeno número de amostras estudadas. Estes resultados reforçam a hipótese de que todos os sorovares estejam presentes na suinocultura de todos os estados brasileiros.

A Tabela 4 mostra a distribuição dos sorovares de *H. parasuis* de acordo com a faixa etária dos animais. A participação do sorovar 5 ocorre principalmente entre 60 e 100, dias o que é observado também para os sorovares 4, 7, 11 e 12. Os sorovares considerados de baixa patogenicidade têm uma distribuição mais uniforme durante a vida do suíno. Como pode ser observado, o sorovar 1 teve uma distribuição bastante equilibrada nas diversas faixas etárias. A maior participação do sorovar 5 na faixa de 60 a 100 dias de idade pode-se relacionar a ocorrência de doença, pois este sorovar é considerado o mais patogênico para suínos e o principal no desencadeamento do quadro de doença de Glässer

Tabela 4. Distribuição dos sorovares de *H. parasuis* segundo a faixa etária. Brasil, 1995-96

Sorovares	Faixa Etária												
	≤39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129	≥130		
1	3	3	4	2	5	8	5	4	6	4	1		
2		1	1		4	3	1		1				
3		2	1	1		1	1		1	1	1		
4		3	3	4	6	6	5	4	2	4	2		
5	2	1	3	8	6	2	6	2		2			
6		1	1	1	1	3	2	3		1			
7	3	1		3	4	4	4	1	2				
8	1	3		2				1	1				
9	6*	2	2		1	2	4			3			
10	1	2		4	3	5	2	4	1	1	1		
11		2	1		4	4	2	1	1	1			
12	2**	3		1	13	8	4	1	1	1	2		
13	1		1	2		1		1					
14				1	4	2	1			1			
15	1		1	1			1						
NS			4	2	5	5	5	3		2	1		
Total	20	24	22	32	56	54	43	25	16	21	8		

* Uma das amostras isolada de um leitão de um dia

** Uma das amostras isoladas de um leitão de cinco dias

Esta doença apresenta lesões macroscópicas graves e é facilmente reconhecida por técnicos e proprietários, o que leva ao encaminhamento de material para diagnóstico em laboratório e, como parte das amostras analisadas foi de material de demanda, justificando em parte os resultados. A distribuição dos sorovares de *H. parasuis*, segundo os espécimes clínicos onde ocorreu o isolamento, é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos sorovares de *H. parasuis* segundo os espécimes clínicos em que ocorreu o isolamento. Brasil, 1995-96

Sorovares	Cérebro	Focinho	Pulmão	Traquéia
1	5	15	17	8
2	1	3	4	3
3		4	3	2
4	3	9	20	7
5		9	13	10
6		3	7	2
7	2	7	11	3
8	2	5		1
9	2	6	8	4
10	1	12	4	7
11		7	7	2
12	2	6	17	11
13		4	2	
14	1	3	5	
15		1	1	1
NS	2	2	19	5
Total	21	96	138	66

O sorovar 5 não foi isolado dos cérebros estudados. Os sorovares 1 e 4 foram os mais frequentemente isolados dos cérebros. No focinho, os sorovares mais freqüentes foram 1, 4, 5 e 10. Na traquéia os sorovares, 1, 4, 5, 10 e 12 foram os mais freqüentes. No

pulmão foram isolados mais frequentemente os sorovares 1, 4, 5 e 12. O sorovar 8 não foi isolado do pulmão dos suínos, mas foi detectado na traquéia, no cérebro, focinho e na secreção nasal. Na traquéia não foram isolados os sorovares 13 e 14, estes resultados foram semelhantes aos encontrados para isolamento a partir do pulmão, com exceção do sorovar 10, que foi mais freqüente na traquéia do que no pulmão. Dos 96 isolamentos do focinho, 14 foram a partir de secreções nasais. As zaragatoas nasais não constituíram um bom sistema para coleta e transporte ao laboratório quando se comparou com o focinho propriamente dito nas condições em que foi conduzido o presente trabalho. Segundo Morozumi & Hiramune (1982), *H. parasuis* permanece viável em salina a 25°C por pouco tempo (4h) e no máximo 8h a 5°C. Nem sempre foi possível cumprir o cronograma de até 24h entre a coleta e a chegada ao laboratório. No focinho a presença de nutrientes e umidade adequada, possivelmente, foram os fatores que permitiram maior número de isolamentos. A zaragatoa nasal deve ser profundamente introduzida no focinho do suíno para se obter uma amostra adequada para o isolamento.

A freqüência de sorovares de *H. parasuis* em animais aparentemente sadios e doentes consta na Tabela 6. É importante observar que mesmo nos animais aparentemente sadios a presença de sorovares considerados virulentos, como 1, 5 e 12, e os de média virulência, como o 4, foi elevada, indicando o estágio de portador sadio. Nos animais doentes não foi observada a presença do sorovar 11. Os sorovares mais isolados nos animais doentes foram os de número 1, 4, 5 e 12, seguidos pelas 26 amostras não-sorotipadas. Estes resultados indicam que amostras não sorotipadas têm potencial patogênico para suínos.

A Tabela 7 apresenta a distribuição dos sorovares de *H. parasuis*, segundo os meses do ano. De modo geral, os sorovares apresentaram distribuição ao longo dos meses estudados no ano, com tendência a se concentrarem nos meses de julho, agosto e

setembro. Estes meses são aqueles em que ocorre elevada amplitude térmica diária, propiciando, assim, manifestações de infecção com *H. parasuis*.

Tabela 6. Frequência de sorovares de *H. parasuis* em suínos sadios e doentes. Brasil, 1995-96

Sorovares	Doentes		Sadios	
	Nº	%	Nº	%
1	42	14,5	3	10
2	10	3,4	1	3,3
3	8	2,8	1	3,3
4	35	12,0	4	13,4
5	30	10,3	2	6,7
6	10	3,4	2	6,7
7	20	6,9	3	10
8	7	2,4	1	3,3
9	19	6,5	1	3,3
10	23	7,9	1	3,3
11	16	5,5		
12	32	11,0	4	13,3
13	4	1,4	2	6,7
14	7	2,4	2	6,7
15	2	0,7	1	3,3
NS	26	8,9	2	6,7
Total	291	100	30	100,0

Tabela 7. Distribuição de sorovares de *H. parasuis* segundo os meses do ano. Brasil, 1995-96

Sorovares	Meses												Total
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
1	2	4	2	2	5	7	2	7	4	1	7	2	45
2			1	2	1	1	2	1		1		2	11
3	1		1			4	1		1	1			9
4	2	1	2	6	4	3	3	6	3	2	4	3	39
5		2	3	5	4	3	4	2	1	1	2	5	32
6		1		1	1	1	2	2	2		2		12
7	1	1	5	1	2		2	4	3	2	2		23
8	1		2				2			2		1	8
9	2	1	3	3	1		2	1	1	1	4	1	20
10		2	1	1	1	3		3	5		5	3	24
11	1	1	1	1	2	1	3		4	1	1		16
12	5	4	1	1	6	3	4	3	4	1		4	36
13							2		1	1		2	6
14		1	1				1		2		2	2	9
15	1				1				1				3
NS	2	1		2	4	2	5	4	2		5	1	28
Total	18	19	23	25	32	28	35	33	34	14	34	26	321

Foram incluídas nos resultados as amostras de demanda que chegaram ao Laboratório para diagnóstico. O número de sorovares por propriedade consta na tabela 8.

Tabela 8. Número de sorovares de *H. parasuis* isolados por propriedades. Brasil, 1995-96

	Nº de sorovares por propriedade							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
Número	145	28	18	6	3	2	2	204
%	71,1	13,7	8,8	2,9	1,5	1,0	1,0	100,0

Em 59 (28,9%) das 204 propriedades estudadas foi detectado mais de um sorovar de *H. parasuis*; destas, 28 (13,7%) estavam infectadas com dois e 18 (8,8%) com três sorovares. Destacam-se propriedades em que foram constatados simultaneamente seis ou sete sorovares diferentes. Esta situação deverá ser levada em consideração nos programas de controle da doença em uma suinocultura, especialmente quando uma das estratégias for a vacinação.

2.4 CONCLUSÕES

Relata-se pela primeira vez na América Latina, e em especial, na região Sudeste do Brasil a presença de todos os sorovares de *Haemophilus parasuis*. Os sorovares mais freqüentes foram os de número 1, 4, 5 e 12, representando 47,4% do total de isolamentos. Destes, o 4 é considerado de média virulência e os demais são considerados de alta virulência para suínos. O aparecimento da doença concentrou-se nos meses de julho, agosto e setembro, atingindo, principalmente, animais entre 70 e 100 dias de idade, isto é, na fase de recria. Quando se for estabelecer um controle da doença deverá levar em consideração que a propriedade pode ter mais de um sorovar de *H. parasuis*.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVARES, J.N. **Estudo da doença de Glässer experimental em leitões oriundos de rebanho formado por uma desmama precoce medicada.** Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1991. 47p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)
- ALEXANDER, T.J.L., THORTON, K., BOON, G. et al. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. **Vet. Rec.**, v.106, n.6, p.114-119 1980.
- BAKOS, K., NILSON, A. THALL, E. Untersuchungen uber *Haemophilus parasuis*. **Nord. Vet. Med.**, v.4, p.241-255, 1952.
- BARBER, R.S., BRAUDE, R., MITHCHELL, K. G. et al. The eradication of virus pneumonia from a herd of large white pigs at a research station. **Vet. Rec.**, v.67, n.37, p.690-691, 1955.
- BARBOSA, C.N. **Ocorrência do *Haemophilus parasuis* em granjas tecnificadas de suínos no Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1996. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)
- BLACKALL, P.J., RAPP-GABRIELSON, V.J., HAMPSON, D.J. Serological characterisation of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. **Aust. Vet. J.**, v.73, n.3, p.93-95, 1996.
-

- BRITO, M.A V.P., BRITO, J. R.F., KLEIN, C.S. Caracterização bioquímica de amostras de *Haemophilus parasuis* isoladas de suínos na região sul do Brasil. **Cien. Rural.** v.24, n.3, p.557-561, 1994.
- BUDDE, R., OLSON, L. Glasser's disease: A clinical case report. In: CONGRESS AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 26, 1995. **Proceedings...** Omaha, AASP, 1995. p.211-215.
- CONNOR, J.F. Modified medicated early weaning. In: CONGRESS AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 21, 1990. **Proceedings...** Omaha, AASP, 1990. p.261-265.
- DAYALU, K.I., ROSS, R.F. Evaluation of experimental vaccines for control of porcine pneumonia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, **Proceedings...** Lausanne, IPVS, 1990. p.83
- DRITZ, S.S., CHENGAPPA, M.M., NELSSSEN, J.L. et al. Growth and microbial flora of nonmedicated, segregated, early weaned pigs from a commercial swine operation. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, n.5, p.711-715, 1996.
- GUTIERREZ, C.B., TASCÓN, R.I., RODRIGUEZ BARBOSA, J.I., et al. Characterization of V factor-dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.16, n.2, p.123-130, 1993.
- HARRIS, D.L. Alternative approaches to eliminating endemic diseases and improving performance of pigs. **Vet. Rec.**, v. 123, n.16, p.422-423, 1988.
-

- KIELSTEIN, P., ROSNER, H., MÜLLER. Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agargel precipitation and the dot-blot procedure. **J. Vet. Med. B.**, v.38, n.4, p.315-320, 1991.
- KIELSTEIN, P., RAPP-GABRIELSON, V.J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.4, p.862-865, 1992.
- MADSEN, P. Atypical outbreaks of Glässer disease in Danish pig herds. In: Congress, In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 8, 1984, **Proceedings...** Ghent, IPVS, 1984. p.107
- MARTIN, S.W., MEEK, A.H., WILLEBERG, P. (ed). **Veterinary Epidemiology principles and methods** 2. ed. Ames: Iowa State Univesrsity, 1988. p.37
- MINIATS, O.P., SMART, N.L., METZGER, K. Glässer's disease in south western Ontario. I. A retrospective study. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 9, 1986, **Proceedings...** Barcelona, IPVS, 1986. p.279
- MØLLER, K., KILIAN, M. V factor-dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.12, p.2711-2716, 1990.
- MOROZUMI, T., HIRAMUNE, T. Effect of temperature on the survival of *Haemophilus parasuis* in physiological saline. **Natl. Inst. Anim. Health. Q.**, v.22, n.2, p.90-91, 1982.
-

- MOROZUMI, T., NICOLET, J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. **J. Clin. Microbiol.**, v.23, n.6, p.1022-1025, 1986.
- NICOLET, J. *Haemophilus* infectious, In: LEMAN, A D. (ed). Disease of swine. 7. ed. Ames; Iowa State University, 1992. p.526-527.
- NICOLET, J., MOROZUMI, T., BLOCH, I. Proposal for a serological classification of *H. parasuis*. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 9, 1986, **Proceedings...** Barcelona, IPVS, 1986. p.260
- NIELSEN, R. Glässer's disease. Clinical and epidemiological field studies. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 6, 1980, **Proceedings...** Copenhagen, IPVS, 1980. p.192
- NIELSEN, R. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. **Acta Vet. Scand.**, v.34, n.2, p.193-198, 1993.
- NIELSEN, R., DANIELSEN, V. An outbreak of Glässer's disease. Studies on etiology, serology and the effect of vaccination. **Nord. Vet. Med.**, v.27, n.1, p.20-25, 1975.
- NIELSEN, J.P., FOGED, N.T., SØRENSEN, V., et al. Protection against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, **Proceedings...** Lausanne, IPVS. 1990. p.55
-

- RAPP-GABRIELSON, V.J., GABRIELSON, D.A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.5, p.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. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.6, p.987-994, 1992.
- ROSNER, H., KIELSTEIN, P., MÜLLER, W. et al. Beziehungen zwischen serotyp, virulenz und sds-page-proteinmustern von *Haemophilus parasuis*. **Deutsch. Tierärztl. Wochenschr.**, v.98, n.9, p.327-330, 1991.
- SCHIMMEL, D., KIELSTEIN, P., HASS, R. Zur serologische typisierung von *Haemophilus parasuis*. **Arch. Exper. Vet. Med.**, v.39, n.6, p.944-947, 1985.
- SILVA, I.J., CAETANO JÚNIOR, J., ZUCHERATO, C.T. et al. Caracterização do sistema produtivo de suínos no Estado de Minas Gerais através de uma base dados. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1997, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: ABRAVES, 1997, p.341-342
- SMART, N.L., MINIATS, O. P. MACINNES, J.I. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. **Can. J. Vet. Res.**, v.52, n.3, p.319-324, 1988.
- SMART, N.L., MINIATS, O.P., ROSENDAL, S. et al. Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario. **Can. Vet. J.**, v.30, n.4, p.339-343, 1989.
-