

SMART, N.L., HURNIK, D., MACINNES, J.I. An investigation of enzootic Glässer's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **Can. Vet. J.**, v.34, n.8, p.478-490, 1993.

SOBESTIANSKY, I., MORES, N., LIEBHOLD, M.M. et al. Doença de Glässer: Uma doença pouco conhecida no Brasil. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1988. 4p. (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico, 137)

van den BOSCH, J.F., PENNING, A.M.M.A, CUIJPERS, M.E.C.M. et al. Heterologous protection induced by a *A pleuropneumoniae* subunit vaccine. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, **Proceedings...** Lausanne, IPVS, 1990. p.11.

WHITTLESTONE, P., BETTS, A.O. The eradication of virus pneumonia of pigs from a commercial herd. **Vet. Rec.**, v.67, n.37, p.692-693, 1955.

CAPITULO 3

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR
HAEMOPHILUS PARASUIS EM GRANJAS DE MANEJO
CONVENCIONAL NO BRASIL**

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *HAEMOPHILUS PARASUIS* EM GRANJAS DE MANEJO CONVENCIONAL NO BRASIL

3.1 INTRODUÇÃO

Rebanhos estabelecidos há anos usando o manejo convencional mas afetados pelos agentes da pneumonia enzoótica, pleuropneumonia suína e/ou rinite atrófica progressiva tiveram, recentemente, à disponibilidade dois procedimentos para o controle destas doenças. O primeiro, e menos dispendioso, é a vacinação contra pneumonia enzoótica (Dayalu & Ross, 1990), pleuropneumonia suína (van den Bosch et al, 1990) e rinite atrófica progressiva (Nielsen et al, 1990) combinada com antibióticos. Estas vacinas, disponíveis no mercado a partir de 1990, têm-se mostrado eficientes no controle destas doenças respiratórias. O outro procedimento consiste em mudanças no fluxo de animais dentro da granja, o que implica, muitas vezes, em construções de novas instalações para adaptação ao sistema 'todos dentro, todos fora'.

Granjas em implantação ou granjas de grande porte, cujos resultados zootécnicos/sanitários/econômicos estão inviabilizando a atividade, podem adotar o sistema de criação Isowean (Harris, 1988) ou Desmama precoce segregada (Connor, 1990). Com a adoção destes sistemas, em algumas propriedades, foi possível o controle e até mesmo a erradicação da pneumonia enzoótica, pleuropneumonia suína e rinite atrófica progressiva, doenças consideradas de grande importância econômica para a suinocultura.

A tendência atual da indústria é manter a população suína isolada em rebanhos de alto padrão sanitário. Neste procedimento há redução das chances de o animal adquirir imunidade por meio de exposição natural (Solano et al., 1996). Rebanhos de suínos de alto padrão sanitário, criados sob rigorosas medidas de manejo para reduzir a difusão de infecções, têm obtido sucesso na erradicação e no controle de muitas doenças. *Haemophilus parasuis*, agente etiológico da doença de Glässer, tem sido uma das poucas exceções, com muitos rebanhos experimentando severos surtos de polisserosite, pneumonia e meningite associados a este microorganismo (Clark, 1995).

Grande parte da suinocultura brasileira adotou a vacinação no controle das doenças respiratórias. Atualmente vem adotando, principalmente em granjas novas ou em implantação, os sistemas de desmame precoce segregado ou Isowean.

A literatura mundial pouco relata sobre os aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus parasuis*, sendo que Desrosiers et al. (1986), Madsen (1984), Peet et al. (1983), Radostits et al. (1963), Riley et al. (1977) e Smart et al. (1989) descrevem sobre aspectos epidemiológicos da infecção em granja de alto 'status' sanitário ou a ocorrência da doença em situações após transporte, isto na suinocultura européia ou da América do Norte. Eles chegaram a induzir que o *H. parasuis* é um agente exclusivo de suinoculturas de alto 'status' sanitário. Não há descrição da infecção pelo *H. parasuis* em países de clima tropical, nem em relação à idade e as fases da criação dos animais, meses do ano, sistema tradicional de criação e presença simultânea de outros agentes bacterianos. No Brasil, Barbosa (1996) fez as primeiras observações sobre o comportamento da infecção pelo agente da doença de Glässer.

O objetivo do presente trabalho foi estudar aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus parasuis* segundo a faixa etária, as estações e os meses do ano, os espécimes clínicos e a

presença simultânea de outros agentes bacterianos em suínos de granjas com manejo convencional no Brasil.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo dos aspectos epidemiológicos da infecção por *H. parasuis*, utilizou-se a mesma matriz de cálculo da amostragem empregada para o estudo da frequência dos diversos sorovares na suinocultura brasileira (Santos et al., 1997)

Os espécimes clínicos para isolamento de *H. parasuis* consistiram de materiais coletados em granjas comerciais, de ciclo completo, com mais de 50 fêmeas, de manejo convencional e sistema 'todos dentro todos fora' nas fases de maternidade e creche, nas principais regiões produtoras de suínos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Goiás, Paraná, Bahia e Mato Grosso, e de material de demanda de diagnóstico de doença de Glässer que chegava ao Laboratório do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório Microvet¹, que cedeu as amostras e informações 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 os espécimes clínicos coletados, embalados em sacos plásticos, transportados para o laboratório, sob refrigeração, em no máximo 24h. Naquelas granjas em que não havia presença de sinais clínicos sugestivos de doença de Glässer, foram selecionados 10 suínos de 60 a 100 dias de idade em diferentes baias e coletadas zaragatoas nasais (Smart et. al., 1989).

¹ Microvet Microbiologia Veterinaria Especial Ltda. Vicoso - MG. Brasil

O isolamento e a identificação de *H. parasuis* foram feitos através do cultivo em ágar sangue base² de carneiro, a 5%, com uma estria de *Staphylococcus aureus* repicado perpendicularmente à semeadura para determinar a dependência do fator V (β nicotinamida adenina dinucleotídeo). As placas foram incubadas a 37°C, por 24h, em jarras com atmosfera de 5% de CO₂, conseguido com a chama de vela (Riley et al., 1977). As colônias que cresceram em satelitismo ao *S. aureus* foram submetidas à coloração de Gram e aos testes para identificação e diferenciação por meio das seguintes provas: hemólise, teste de CAMP, urease, catalase e utilização da arabinose, lactose, glicose, manitol e rafinose, segundo Møller & Killian (1990) e Gutierrez et al. (1993). As amostras identificadas como *H. parasuis* foram liofilizadas até a terceira passagem 'in vitro'. Os materiais coletados foram processados também em ágar G20G (Smith & Baskerville, 1979) e para isolamento de outros patógenos bacterianos do trato respiratório de suínos, segundo Carter & Cole (1990).

Foram coletados materiais em 115 propriedades, obtendo-se 210 amostras de *H. parasuis*. Os materiais de demanda cedidos pelo Laboratório da Universidade Federal de Viçosa foram 29 amostras de 26 propriedades, os outros materiais de demanda, 82 amostras de 63 propriedades, foram cedidos pelo Laboratório Microvet.

O isolamento de *H. parasuis* foi analisado em relação ao estado de origem, à faixa etária dos animais, época do ano, ao mês, espécime clínico e à presença de outros agentes bacterianos patogênicos.

² Difco Laboratories, Detroit - MI, EUA

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas 204 propriedades estudadas (Tabela 1), foram isoladas 321 amostras de *H. parasuis* de pulmões, focinhos, zaragatoas nasais e cérebros. Em Minas Gerais, foram isoladas 211 (65,7%) amostras nas 129 propriedades estudadas. Este maior número em Minas Gerais deve-se, principalmente, ao fato de os Laboratórios estarem localizados na Zona da Mata, região de maior suinocultura do Estado, facilitando a coleta e remessa dos espécimes clínicos. A grande maioria das granjas era positiva para pneumonia enzoótica, pleuropneumonia suína e rinite atrófica progressiva, mas adotava esquemas de vacinações e medicações estratégicas para o controle destas doenças.

Os isolamentos nos diversos Estados indicam a participação de *H. parasuis* de forma evidente na suinocultura brasileira e em especial da Região Sudeste. Relatos anteriores de Brito et al. (1994) e Barbosa (1996) mencionaram a participação do *H. parasuis* na suinocultura brasileira, na região Sul do País e em Minas Gerais, respectivamente.

Tabela 1 Isolamento de amostras de *H. parasuis* segundo os Estados. Brasil, 1995-96.

| Amostras isoladas | Estados | | | | | | | | Total |
|-------------------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-------|
| | BA | MT | GO | PR | RJ | ES | SP | MG | |
| Número | 1 | 1 | 8 | 11 | 17 | 17 | 55 | 211 | 321 |
| % | 0,3 | 0,3 | 2,5 | 3,4 | 5,3 | 5,3 | 17,2 | 65,7 | 100,0 |

Observou-se que 291 (90,6%) das amostras foram isoladas de animais doentes e 30 (9,3%) de animais aparentemente saudios. Este fato indica que mesmo os animais aparentemente saudios podem ser portadores de *H. parasuis* e, assim, disseminar o agente dentro e para outros plantéis. Segundo Nicolet (1992), *H. parasuis* é comumente recuperado da cavidade nasal de suínos saudáveis. Os animais de reposição, em sua maioria de granjas de alto padrão sanitário ou livres de patógenos específicos, são tidos como os responsáveis pela introdução do agente nas granjas comerciais ou mesmo nas livres de patógenos específicos (Peet et al., 1983; Madsen, 1984; *Haemophilus parasuis* ..., 1993).

Segundo Nicolet (1992), o isolamento de *H. parasuis* em laboratório é difícil, justificando, em parte, os resultados encontrados. Nos animais aparentemente saudios, o agente apresenta-se em menor número, dificultando assim o seu isolamento a partir da flora do trato respiratório. No animal doente, o agente está presente em grande número, em alguns casos como agente único, facilitando o seu isolamento e reconhecimento. Entretanto, Riley et al. (1977), Peet et al. (1983) e Smart et al. (1993) relatam dificuldades no isolamento de *H. parasuis* de casos clínicos de campo e Miniats et al. (1991) e Barigazzi et al. (1994), o pequeno número ou mesmo a ausência de isolamento em animais desafiados experimentalmente.

O isolamento de *H. parasuis*, segundo as faixas etárias, consta na Tabela 2. A faixa etária de 70-79 dias foi a de maior frequência de isolamento, seguida de 80-89 e 90-99. A fase de recria é a de maior frequência da infecção.

Tabela 2. Distribuição do isolamento de *H. parasuis* segundo as faixas etárias dos suínos. Brasil, 1995-96

| Amostras isoladas | Faixa Etária* | | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|-------|
| | ≤ 39 | 40-49 | 50-59 | 60-69 | 70-79 | 80-89 | 90-99 | 100-109 | 110-119 | 120-129 | ≥ 130 |
| Número | 20 | 24 | 22 | 32 | 56 | 54 | 43 | 25 | 16 | 21 | 8 |
| % | 6,2 | 7,5 | 6,8 | 10,0 | 17,4 | 16,8 | 13,4 | 7,8 | 5,0 | 6,5 | 2,5 |

* Faixa etária, em dias.

É interessante observar que, mesmo em animais muito jovens, pode-se isolar *H. parasuis*, como na creche com idade inferior a 39 dias e na maternidade em que se isolou de um leitão de um dia dois leitões de cinco dias e três de 10 dias. Também ocorreram isolamentos em leitões de 12 e 15 dias de idade. Isso indica a susceptibilidade dos leitões de contaminarem-se na maternidade, ainda muito jovens, com um a cinco dias de idade. A consequência é a dificuldade na erradicação do agente em uma propriedade, mesmo quando se usa o sistema de desmama precoce segregada ou o sistema de três sítios, o que foi observado também por Clark (1995). Esta contaminação na maternidade sem dúvida tem origem na porca, o que pode ser confirmado pelo isolamento em animais adultos, como em marrãs de reposição, com 180 dias de idade. Deve-se ressaltar que a contaminação na creche manteve-se num percentual elevado, e quando os animais foram transferidos para a recria a infecção aumentou. Ao atingir a fase de terminação há uma redução nos índices de isolamento, indicando, possivelmente, o desenvolvimento de imunidade. Mas alguns animais permanecem como portadores, e quando incorporados no rebanho de produção eliminam *H. parasuis* para animais vizinhos e, no caso das porcas, para os leitões na maternidade. É possível que a eliminação e, conseqüente, contaminação dos leitões ocorra logo após o parto e não tardiamente, como é citado na literatura, haja visto o isolamento em leitões de um e cinco dias de idade.

O isolamento de *H. parasuis*, segundo as estações climáticas do ano, é apresentado na Tabela 3. A época fria do ano é aquela com maior número de isolamentos, 96 (29,9%). Os leitões ao saírem da creche para a recria deslocam-se de um ambiente com temperatura controlada, sem corrente de vento, para instalações, em geral, sem proteção contra o frio. O estresse provocado pelo transporte, a mudança de ambiente e a mistura de lotes contribuem para a baixa da resistência e o desenvolvimento da doença. Outro fator que poderia estar contribuindo para o aumento da incidência nessa fase é a presença de lâmina d'água na época da estação fria do ano, isto

porque os animais se molham muito, com isso molham o piso das baias, contribuindo para a queda da temperatura nas instalações e, conseqüentemente, saindo da zona de conforto térmico. Apesar de a doença ocorrer em maior freqüência no inverno, há pouca diferença entre as estações, indicando certa uniformidade ao longo do ano. Isto em granjas com sistema de criação contínuo ou 'tudo dentro, tudo fora' nas fases de maternidade e creche.

Tabela 3. Isolamento de *H. parasuis* de acordo com as estações do ano. Brasil, 1995-96

| Isolamento | Estações do ano | | | |
|------------|-----------------|--------|---------|-----------|
| | Verão | Outono | Inverno | Primavera |
| Número | 63 | 80 | 96 | 82 |
| % | 19,6 | 24,9 | 29,9 | 25,5 |

A baixa e/ou ausência de imunidade, juntamente com os fatores estressantes, propiciam o desenvolvimento da infecção por *H. parasuis*, principalmente na recria, nos meses mais frios do ano (Tabela 4).

Tabela 4. Isolamento de *H. parasuis* segundo os meses do ano. Brasil, 1995-1996

| Isolamento | Meses | | | | | | | | | | | |
|------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|------|-----|
| | J | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| Número | 18 | 19 | 23 | 25 | 32 | 28 | 35 | 33 | 34 | 14 | 34 | 26 |
| % | 5,6 | 5,9 | 7,2 | 7,8 | 9,9 | 8,7 | 10,9 | 10,3 | 10,6 | 4,4 | 10,6 | 8,1 |

Os meses de julho, agosto e setembro foram os que apresentaram maior ocorrência de isolamentos de *H. parasuis*, reforçando a importância das baixas temperaturas no desenvolvimento da doença, além de outros fatores estressantes, resultados também observados por Barbosa (1996). Em geral, nestes meses as principais

características de temperatura na região Sudeste são: a grande amplitude térmica diária e a presença de correntes de vento, estas características climáticas, associadas à baixa imunidade, parecem ser os principais fatores envolvidos no desencadeamento da doença na fase de recria. O mês de novembro apresentou uma frequência mais elevada, semelhante à dos meses de maior ocorrência. A possível explicação para este fato seria as chuvas que ocorrem nesta época do ano e que contribuiriam para as flutuações da amplitude térmica. O resultado do isolamento de *H. parasuis* por espécime clínico consta na Tabela 5.

Tabela 5. Isolamento de *H. parasuis* por espécime clínico. Brasil, 1995-96

| Amostras isoladas | Espécime clínico | | | | Total |
|----------------------|------------------|---------|--------|----------|-------|
| | Cérebro | Focinho | Pulmão | Traquéia | |
| Número | 21 | 96 | 138 | 66 | 321 |
| % | 6,5 | 29,9 | 43,0 | 20,6 | 100 |

As 21 amostras de *H. parasuis* isoladas do cérebro representam 6,5% de todos os isolamentos, sugerindo uma frequência pouco acentuada de casos de encefalite por *H. parasuis*, quando comparado aos outros isolamentos. O uso de zaragatoa nasal para isolamento não apresentou bons resultados, possivelmente pela morte de *H. parasuis* por dessecação ou por falhas na coleta, por não ter atingido a área específica, pois o estilete tem que ser introduzido o mais profundo possível no nariz do suíno. O uso desta técnica de coleta permitiu o isolamento de 14 (4,4%) das 96 amostras totais isoladas dos focinhos. Estes números sugerem que o uso de zaragatoas nasais não é um processo recomendável para coleta de espécimes visando ao isolamento de *H. parasuis*. Da traquéia isolaram-se 66 (20,6%) amostras, indicando que este local deve também ser considerado quando se deseja isolar *H. parasuis* em suínos, mesmo tendo um isolamento proporcionalmente menor

do que o pulmão. No pulmão foram isoladas 138 (43,0%) amostras e do focinho, 96 (29,9%). O maior número de amostras isoladas diretamente do pulmão deve-se principalmente ao fato de os órgãos examinados terem origem em animais acometidos por doença clínica, em especial doença respiratória, caracterizada por quadro de dispnéia, com respiração abdominal e febre. Nestes casos o pulmão, em geral, está acometido. Os casos de infecção da mucosa nasal não geram sinais clínicos tão visíveis a ponto de chamar a atenção do produtor.

H. parasuis foi observado nos suínos como único agente ou em associação com outros agentes bacterianos, alguns graves, outros sem definição da patogenicidade. A Tabela 6 apresenta a ocorrência ou não de outros agentes bacterianos quando do isolamento de *H. parasuis*.

Como único agente, *H. parasuis* foi isolado em 122 materiais examinados, sendo 100 em 291 amostras de animais doentes e 22 em 30 amostras de animais aparentemente saudáveis, representando, respectivamente, 34,4 e 73,3% de cada extrato. O isolamento em 34,4% das amostras de animais doentes como único agente indica uma participação efetiva como agente primário nas infecções em suínos, especialmente tratando-se de granjas convencionais, contaminadas por diversos agentes patogênicos, principalmente os respiratórios. Os resultados indicam uma participação efetiva de *Streptococcus* sp. Outros agentes como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* tipos A e D e *Bordetella bronchiseptica*, tradicionalmente envolvidos em infecções do trato respiratório de suínos, estavam presentes, mas com frequências baixas, indicando possível controle, quer seja por medicação, vacinação e/ou manejo. *H. parasuis* e *Streptococcus* sp estão aumentando as suas participações nas infecções dos suínos, possivelmente pelas técnicas de manejo e pelos programas de vacinação, que até então privilegiaram o controle da pleuropneumonia suína, pneumonia enzoótica e rinite atrófica progressiva, permitindo assim que estes patógenos ajam sem qualquer controle.

3.4 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido o presente trabalho, pode-se afirmar que na suinocultura brasileira, principalmente nos estados da Região Sudeste, suínos doentes e aparentemente sadios podem ser portadores de *Haemophilus parasuis*. Nos meses de julho, agosto e setembro observou-se maior frequência de infecções por *H. parasuis*, possivelmente pela grande amplitude térmica diária que se verifica nestes meses do ano. A idade de 70 a 100 dias, que coincide com a fase de recria, constitui a principal faixa etária para isolamento do *H. parasuis*.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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)
- BARIGAZZI, G., VALENZA, F., BOLLO, E. et al. Anatomohistopathological features related to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, **Proceedings...** Bangkok, IPVS. 1994. p.235
- 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.
- CARTER, G.R. & COLE, J.R. (ed). **Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology.** 5. ed. New York, Academic Press, 1990. 620 p.
- CLARK, L.K. Sew: program, problems, performance, potential profits and methods of implementation for various herd sizes. In: GEORGE A YOUNG SWINE CONFERENCE, 1995, Concord. Concord: University of Nebraska, 1995. P.1-14.
-

- 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.
- DESROSIERS, R., PHANEUF, J.B., BROES, A. et al. An outbreak of atypical Glässer's disease in Quebec. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 9, 1986, **Proceedings...** Barcelona, IPVS, 1986. p.277.
- 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.
- HAEMOPHILUS parasuis, part 1. **Agri-Pract**, v.14, n.3, p.19-23, 1993.
- MADSEN, P. Atypical outbreaks of Glässer disease in Danish pig herds. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 8, 1984, **Proceedings...** Ghent, IPVS, 1984. p.107.

- MINIATS, O.P., SMART, N.L., ROSENDAL, S. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, n.1, p.37-41, 1991.
- 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.
- NICOLET, J. *Haemophilus* infectious, In: LEMAN, A.D. (ed). **Disease of swine**. 7. ed. Ames; Iowa State University, 1992. p.526-527.
- 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
- PEET, R.L., FRY, J., LLOYD, J. et al. *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs. **Aust. Vet. J.**, v.60, n.6, p.187, 1983.
- RADOSTITS, O M., LOUISE RUHNKE, H., LOSOS, G.J. Na outbreak of meningitis in swine caused by *Haemophilus* species of bacterium. **Can. Vet. J.**, v. 4, n.10, p.265-270, 1963.
- RILEY, M.G.I., RUSSELL, E.G., CALLINAN, R.B. *Haemophilus parasuis* infection in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.171, n.7. p.649-651, 1977.
- SANTOS, J.L. **Epidemiologia e controle da infecção por *Haemophilus parasuis***. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1997. 139p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Cap. 2 Frequência de *Haemophilus parasuis* no Brasil. p.21-50.
-

- 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.
- SMART, N.L., HURNIK, D., MACINNES, J.I. An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **Can. Vet. J.**, v.34, n.8, p.478-490, 1993.
- SMITH, I.M. & BASKERVILLE, A J. A selective medium for the isolation of *P. multocida* in nasal specimens from pigs. **Br. Vet. J.**, v.139, n.6, p.476-486, 1979.
- SOLANO, G., RAPP-GABRIELSON, V., CARVALHO, L., et al. Impact of maternal immunity on subsequent challenge of piglets with *Haemophilus parasuis*. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996, **Proceedings...** Bologna, IPVS, 1996. p. 382
- van den BOSCH, J.F., PENNING, A.M.M.A, CULPERS, M.E.C.M. et al. Heterologous protection induced by a *A pleuropneumoniae* subunit vaccine. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990, **Proceedings...** Lausanne, IPVS, 1990. p.11

CAPITULO 4

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA
MONOVALENTE DE *HAEMOPHILUS PARASUIS***

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA MONOVALENTE DE *HAEMOPHILUS PARASUIS*

4.1 INTRODUÇÃO

A partir de 1988, com o desenvolvimento do sistema de criação em dois ou três sítios (Harris 1988) ou do desmame precoce segregado (Connor, 1990), a suinocultura mundial experimentou grande avanço no controle das doenças. Estas técnicas objetivaram a viabilização econômica de unidades de produção afetadas no seu desempenho zootécnico/econômico/sanitário pela ocorrência de doenças que, apesar de programas de medicação estratégica e vacinações, não atingiam um nível econômico para a atividade. Estes sistemas são os recomendados atualmente para granjas em implantação ou para aquelas onde não se obtêm bom resultado econômico na atividade, pois, uma vez implantados, conseguem manter a granja livre de doenças ou tornam possível programas de controle e/ou erradicação de doenças economicamente importantes. Os sistemas de produção assim operados são considerados de alto padrão sanitário.

Em 1990, desenvolveu-se a vacina contra pneumonia enzoótica (Dayalu & Ross, 1990) e aplicaram-se novas tecnologias na produção das vacinas contra pleuropneumonia suína (van den Bosch et al., 1990) e rinite atrófica progressiva (Nielsen et al., 1990). O uso combinado destas vacinas e de programas de medicação estratégica permitiram o controle efetivo de doenças respiratórias consideradas importantes economicamente. As granjas que adotaram os procedimentos de vacinação e medicação atingiram

desempenho semelhante às de alto padrão sanitário, observando-se pouquíssimos casos clínicos destas doenças.

Haemophilus parasuis é o agente etiológico da Doença de Glässer que se caracteriza por polisserosite fibrinosa e artrite. É uma doença de ocorrência esporádica, que afeta animais jovens de duas semanas a quatro meses de idade, submetidos a situações de estresse (Nicolet, 1992). *H. parasuis* é um dos poucos agentes que não são controlados pelas práticas de manejo supracitadas. Os rebanhos estabelecidos com base nos sistemas de criações em três sítios ou de desmama precoce medicada têm como característica um programa completo de biossegurança, no qual permanecem fechados e sob rígido controle sanitário. Nestas situações os animais não têm oportunidade de desenvolver imunidade para *H. parasuis* pelo sistema de criação que impõe um fluxo impedindo o contato de animais de idades diferentes e conseqüente difusão do agente e pelo rigor sanitário na introdução de animais de reposição que são de origem controlada, livres de *H. parasuis*. Entretanto, surtos graves da doença de Glässer têm sido relatados em granjas de alto padrão sanitário e também naquelas em que se obteve o controle via programas de vacinação/medicação. Em granjas livres de patógenos específicos (SPF) *H. parasuis* ocorre em forma de surtos (Madsen, 1984), não necessita de estresse para se implantar e acomete animais de todas as idades. Nestas situações o controle proposto tem sido a vacinação. O primeiro relato do uso de bacterina autogena para o controle de um surto de doença de Glässer foi realizado por Nielsen & Danielsen (1975), posteriormente outros relatos abordaram o mesmo tema (Riising, 1981; Smart et al., 1993; Budde & Olson, 1995) e, em todos, obteve-se sucesso no controle da doença. Tem sido observado também que animais de rebanho de alto padrão sanitário, quando introduzidos em rebanhos convencionais, como reposição genética, são duramente afetados pela doença de Glässer (*H. parasuis*, 1993). Testes com vacinas comerciais contra *H. parasuis* têm sido desenvolvidos nos EUA (Rapp-Gabrielson et al., 1994; Trigo et al., 1996).

A suinocultura tecnificada brasileira passa por um período de rápida modernização, visando adequar-se à globalização da economia. Os procedimentos para controle das doenças respiratórias, principalmente vacinações associadas com medicação estratégicas, têm sido adotados em larga escala. Relatos da ocorrência do agente e da doença de Glässer têm sido feitos por pesquisadores (Sobestiansky et al., 1988; Brito et al., 1994; Barbosa, 1996). Na realidade, a ocorrência da doença pode estar subestimada, tendo em vista a dificuldade no isolamento do agente (Nicolet, 1992). *H. parasuis* está presente em nosso meio com todos os 15 sorovares (Santos et al., 1997). O sorovar cinco é considerado o mais patogênico e o principal envolvido nos casos de Doença de Glässer.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de uma bacterina monovalente contra o *H. parasuis*, usando o sorovar cinco.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Ativação da virulência do sorovar 5 (Nagazaki)

O sorovar 5 (Nagazaki)¹ de *H. parasuis* foi cultivado em placas de ágar PPLO²-S (suplementado com 5% de soro de coelho e 0,004% de NAD³ - β nicotinamida adenina dinucleotídeo), incubadas por 16h a 37°C, em jarra com atmosfera de 5% de CO₂, conseguido com a chama de vela. O crescimento bacteriano foi colhido em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2 e centrifugado por 20 min a 8.000 x g a 4°C. O sedimento foi suspenso em PBS e padronizado para conter 10¹⁰ a 10¹¹ UFC/mL pela comparação visual com o tubo 10 da escala de MacFarland.

Cinco leitões de 50 dias de idade oriundos de rebanho de 'doença mínima', livre de *H. parasuis*, foram inoculados para ativar a virulência do *H. parasuis* sorovar 5 (Nagazaki). O primeiro suíno foi inoculado com quatro mililitros de uma suspensão contendo 1,04x10¹¹ UFC/mL, por via intratraqueal, com ajuda de um trocater (2 x 50mm) e sonda endotraqueal⁴ (1,7 x 203mm). O suíno foi sacrificado e necropsiado após apresentação dos sinais clínicos e/ou morte em até quatro dias após o desafio. Foram coletados espécimes clínicos do pulmão, da traquéia, pleura, do pericárdio, peritônio, cérebro, baço e líquido sinovial da articulação tíbio-

¹ Gentilmente cedido pelo Dr. P. Kielstein, Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes, Jena, Alemanha.

² Difco Laboratories, Detroit - MI, EUA

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

⁴ Intracath, Becton Dickinson, Sandy - UT, EUA

társica para cultura em ágar sangue com estria perpendicular de *Staphylococcus aureus* e em ágar PPLO-S. *H. parasuis*, recuperado dos espécimes clínicos e confirmado como sorovar 5, foi utilizado para inoculação do segundo animal de modo semelhante ao primeiro e, assim, sucessivamente até completar o quinto animal. O título do inóculo para o segundo animal foi de $1,48 \times 10^{10}$ UFC/mL, para o terceiro de $1,8 \times 10^{10}$ UFC/mL, para o quarto de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL e para o quinto de $3,0 \times 10^9$ UFC/mL. A amostra de *H. parasuis* recuperada do quinto suíno e após confirmação como sorovar 5 foi liofilizada.

Produção da Bacterina Monovalente.

O sorotipo de referência sorovar 5 (Nagasaki) de *H. parasuis*, recuperado do quinto suíno, foi cultivado em placas de ágar PPLO-S por 16h a 37°C em jarra com ambiente de CO₂. O crescimento bacteriano foi colhido em PBS, pH 7,2 e centrifugado a 8.000 x g por, 20min. A pureza da massa bacteriana foi verificada em esfregaços corados pela coloração de Gram e cultura em ágar PPLO-S. O depósito foi suspenso em PBS, pH 7,2, contendo 0,2% de formalina a 37%. A concentração final da suspensão foi padronizada para 10⁹ UFC/mL (Miniats et. al., 1991) pela comparação visual com o tubo 9 da escala de MacFarland. Após 12h a 37°C a suspensão formolizada foi submetida a testes de esterilidade em ágar PPLO-S e em tioglicolato de Brewer². A vacina consistiu na emulsão da suspensão bacteriana com o adjuvante oleoso para uma concentração final de 20% do adjuvante⁵. O teste de inocuidade foi realizado em 10 camundongos de 21 dias de idade e em dois suínos de 50 dias de idade, oriundos de rebanho de 'doença mínima'. Os camundongos foram inoculados com 0,2 mL, via intraperitoneal e os suínos com 2,0 mL, via intramuscular, e observados por 10 dias.

⁵ Emulsigen®, MVP Laboratories. - NE, EUA

Grupos experimentais

Sessenta e quatro leitões, machos, não emasculados, desmamados aos 21 dias de idade, oriundos de rebanho de 'doença mínima', livre de *H. parasuis*, foram divididos ao acaso em dois grupos, A e B, de 32 leitões cada, alojados em baias com quatro animais cada, em uma sala de creche, previamente limpa e desinfetada. A temperatura foi mantida em $28 \pm 1^\circ\text{C}$. O arraçoamento foi com ração pré-inicial até 35 dias, ração inicial I até 49 dias e ração inicial II até 70 dias, ração recria até 110 dias e ração terminação até o final. Todas as rações eram livres de antibióticos ou promotores de crescimento. Aos 80 dias de idade os suínos foram transferidos para o galpão de recria. Foi mantida a identificação utilizada pela granja de origem para cada animal. Os animais foram pesados aos 21, 64, 118 e 144 dias de idade.

Para confirmar a ausência de *H. parasuis* e outros patógenos do trato respiratório nos suínos, foram coletadas, ao acaso, aos 25 dias de idade, zaragatoas nasais de 10 leitões, sendo cinco do grupo A e outros cinco do grupo B, de modo a se testar um animal por baia. As zaragatoas foram cultivadas em ágar PPLO-S, ágar sangue² de carneiro a 5%, com uma estria de *Staphylococcus aureus* (Möller & Killian, 1990; Gutierrez et al., 1993) e, ágar G20G (Smith & Baskerville, 1979) e os procedimentos recomendados por Carter & Cole (1990), dando-se atenção especial ao isolamento de *H. parasuis*.

Vacinação

O grupo A foi vacinado com a bacterina monovalente de *H. parasuis* sorovar 5, na dose de 2,0 e 3,0 mL, via intramuscular, aos 25 e 52 dias de idade. O grupo B permaneceu como testemunha, não-vacinado. Os animais do grupo A foram observados para a presença de reações adversas por até 10 dias após a vacinação.

Desafio homólogo

Todos os leitões dos grupos A e B foram desafiados aos 65 dias de idade, com 4 mL de $1,3 \times 10^9$ UFC/mL de *H. parasuis* sorovar 5, pela via intratraqueal, com ajuda de um trocater e sonda endotraqueal e observados quanto aos sinais clínicos. Vinte e dois dias após o desafio, 12 suínos do grupo A foram sacrificados e necropsiados e coletou-se material para cultura microbiológica e isolamento de *H. parasuis*. Aos 90 dias de idade, os demais animais do grupo A foram emasculados. Aos 118 dias foram novamente desafiados, sendo que o título do desafio foi de $2,5 \times 10^9$ UFC/mL de *H. parasuis* sorovar 5. Aos 143 dias de idade foram sacrificados, necropsiados e coletado material para exames microbiológicos, com atenção para o isolamento e a contagem de colônias de *H. parasuis* nos espécimes clínicos.

Avaliação da Proteção da Bacterina

Os resultados do desafio homólogo foram analisados pelo teste de χ^2 .

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da ativação da virulência do sorovar 5 de *H. parasuis* pela passagem seriada em cinco suínos de 50 dias de idade são apresentados na tabela 1

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 *H. parasuis*.

| Suínos | Inóculo UFC/mL | Morte p.i./h | Lesões macroscópicas | Isolamento <i>H. parasuis</i> |
|--------|-----------------------|-----------------|---|--|
| 1° | 1,04x10 ¹¹ | >96 | Tíbio/társica, | Líquido sinovial |
| 2° | 1,48x10 ¹⁰ | 48 | Pl e perit | Pl, peric, perit, cer, |
| 3° | 1,8x10 ¹⁰ | 38 | Pl e peric | Pul, traq, peric, cer, |
| 4° | 2,0x10 ¹⁰ | 34 | Pul e cer. | Traq, Pul, cer |
| 5° | 3,0x10 ⁹ | 22 | Pul, pl, perit, peric, tíbio/társica | Pul, pl, perit, baço, peric, traq, Tíbio/ társica, |

Pl = pleura, perit= peritônio, peric= pericárdio, pul= pulmão, traq= traquéia e cer= cérebro

A concentração bacteriana (UFC/mL) do inóculo foi determinada pela contagem de colônias das diluições em placas de ágar PPLO-S preparadas em duplicatas. O primeiro suíno utilizado no teste de ativação da virulência do sorovar 5 apresentou somente aumento de volume na articulação tíbio-társica a partir do terceiro dia após inoculação (p.i.). No quarto dia este animal foi sacrificado e necropsiado e não foi observada qualquer alteração macroscópica. Foi isolado *H. parasuis* somente do líquido sinovial. O segundo suíno inoculado morreu aproximadamente 48h p.i.. À necropsia observaram-se depósitos de fibrina na pleura, poucos e pequenos

depósitos difusamente espalhados no peritônio. *H. parasuis* foi isolado do pulmão, da traquéia, do peritônio, cérebro, pericárdio e baço. O terceiro, quarto e quinto suínos morreram em 38, 34 e 22h p.i., respectivamente. À necropsia observou-se no terceiro suíno presença de fibrina na pleura e pericárdio. *H. parasuis* foi isolado do pulmão, da traquéia, do pericárdio e cérebro. No quarto animal as lesões macroscópicas localizaram-se no pulmão e na pleura, com grande depósito de fibrina. *H. parasuis* foi isolado da traquéia, do pulmão e do cérebro. No quinto animal havia depósito de fibrina em pequenas quantidades na pleura, no peritônio e pericárdio, isolou-se o *H. parasuis* do pulmão, da traquéia, do baço, da pleura, articulação, do peritônio e pericárdio. O número de colônias isoladas dos espécimes clínicos coletados no quinto suíno foi maior do que nos animais anteriores, indicando que o sorovar 5 estava com alta virulência. Não foram isolados dos materiais coletados à necropsia dos cinco animais inoculados quaisquer outros agentes bacterianos patogênicos para suínos. O título dos inóculos utilizados para produzir a infecção foi entre 10^{11} a 10^{10} (Tab. 1). Na primeira inoculação a concentração de 10^{11} UFC/mL foi necessária, tendo em vista tratar-se do sorovar 5 de referência, amostra que vem sendo mantida em meios artificiais há mais de 10 anos (Morozumi & Nicolet, 1986).

Dificuldades, ou insucesso, na reprodução experimental da doença de Glässer foram relatadas por outros autores. Morozumi et al (1981) inocularam 4,0 mL de 1×10^9 UFC/mL do sorovar 4 de *H. parasuis* pela via intraperitoneal e reproduziram o quadro em 66% dos animais desafiados. Quando inocularam dosagens menores, 10^7 ou 10^6 , não foram observadas manifestações de infecção. Barigazzi, et al. (1994) empregaram 5mL dos sorovares 13 e 14, com títulos de 3×10^9 UFC/mL, pela via intranasal e constataram ligeira febre e lesões pulmonares nos animais desafiados somente com o sorovar 14. Pöhle et al. (1992) obtiveram sucesso quando usaram pela via

intratraqueal doses $>10^{10}$, reproduzindo quadros de broncopneumonia, mas não da doença de Glässer.

A massa bacteriana obtida da cultura do sorovar 5 apresentou-se como cocobacilos pequenos, Gram negativos. A cultura da massa bacteriana em ágar PPLO-S apresentou em 16h crescimento uniforme de colônias circulares, translúcidas de 1mm de diâmetro. O teste de esterilidade da massa bacteriana em ágar PPLO-S e tioglicolato de Brewer foi negativo para o crescimento de qualquer agente bacteriano pelo período de 48h e 7 dias, respectivamente. Os camundongos inoculados não revelaram nenhum sinal clínico após a inoculação da bacterina. Os dois suínos apresentaram, após a inoculação intramuscular, vômito, pêlos arrepiados e tremores musculares, que iniciaram a aproximadamente 20min após a inoculação e desapareceram nos 30min seguintes, indicando, possivelmente, a presença de endotoxinas. Nos 10 dias seguintes após as inoculações não foram observadas quaisquer reações locais ou sistêmicas que pudessem ser atribuídas à vacina, tanto nos camundongos quanto nos suínos.

Os resultados da cultura das 10 zaragatoas nasais não indicaram diferença entre a flora nasal dos suínos do grupo A em relação à do grupo B. Em ambos os grupos o isolamento de *Streptococcus* sp foi o predominante, tendo sido detectado em quatro animais do grupo B e em três do grupo A, sendo em alguns em cultura pura. *Escherichia coli* foi observada em cultura única em um animal do grupo B e associada a *Streptococcus* sp em outros dois. No grupo A *Escherichia coli* foi isolada como única bactéria em dois animais e associada à *Streptococcus* sp em outros dois. Não foi detectada a presença de *H. parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

O peso dos leitões é mostrado na Tabela 2. Aos 21 dias de idade os suínos pesaram $5,89 \pm 0,12$ kg, aos 64 dias $28,44 \pm 4,10$ kg para o

grupo A e de $29,60 \pm 3,91$ kg para o grupo B. Aos 118 dias o peso dos 20 animais restantes do grupo A foi de $84,12 \pm 7,46$ kg e aos 144 dias, de $114,99 \pm 9,57$ kg. O peso a desmama está dentro da normalidade esperada para os padrões atuais (Straw & Meuten, 1992). Na época do ano em que foi feito este trabalho (mês de dezembro), a temperatura ambiente é elevada e a produção de leite das porcas diminui, afetando o peso dos leitões. O peso aos 64 dias indica, claramente, um desempenho acima da média, refletindo assim o padrão sanitário dos animais e o manejo adotado de produção em três sítios (Clark, 1995). O ganho médio de peso diário na fase da creche foi de 0,444kg.

O ganho de peso diário do nascimento até o sacrifício aos 144 dias foi de 0,79kg, já da fase pós-desmama até o sacrifício o ganho médio de peso diário foi de 0,886kg. Resultados de peso semelhantes foram obtidos por Clark (1995) ao trabalhar com um sistema de desmame precoce e em três sítios. É interessante notar que, apesar dos dois desafios, ao que foram submetidos os animais, o peso final ficou muito elevado, não traduzindo um possível efeito maléfico do desafio e/ou da possível infecção com *H. parasuis*. Após a emasculação, utilizou-se antissépticos na ferida cirúrgica e não se fez uso de antibióticos. Os resultados de ganho de peso dos animais vacinados viabilizam economicamente qualquer granja de suínos.

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

| Suínos | 21 dias | 64 dias | 118 dias* | 144 dias* |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Vacinados | $5,89 \pm 0,12$ | $28,44 \pm 4,10$ | $84,12 \pm 7,46$ | $114,99 \pm 9,57$ |
| GPD ¹ | 0,28 | 0,44 | 0,71 | 0,79 |
| Não vacinados | $5,89 \pm 0,11$ | $29,60 \pm 3,91$ | | |
| GPD | 0,28 | 0,46 | | |

* refere-se aos 20 sobreviventes do grupo A e ¹ GPD = Ganho de peso diário.

Reações imediatas após a vacinação foram observadas em 24 leitões (75%), que se caracterizaram por vômitos, tremores musculares e taquipnéia (Tabela 3). As reações iniciaram 20min após a vacinação e cessaram nos 40min subseqüentes. A partir de então, os leitões apresentaram um quadro de sonolência que perdurou por até 8h. Nos 10 dias seguintes não foram observadas quaisquer reações locais ou sistêmicas que pudessem ser atribuídas à vacinação. Após a segunda aplicação da vacina, aos 52 dias de idade, 24 (75%) dos 32 animais apresentaram reações. Vômito foi a reação mais freqüente, tendo ocorrido em 17 (53,12%) dos suínos, e taquipnéia, em cinco. Dois animais apresentaram pêlos arrepiados, associado a tremores musculares. Essas reações foram observadas a aproximadamente 30min após a vacinação e desapareceram nos 30min seguintes. A partir de então, os animais apresentaram um quadro de sonolência que perdurou por aproximadamente 8h. Nos 10 dias após a vacinação não se evidenciou qualquer tipo de reação local ou sistêmica. Estes sintomas sugerem a presença na bacterina de substâncias tóxicas, principalmente do tipo endotoxinas e em especial lipídio A, que poderia ser responsável pelos sintomas observados nos animais.

Tabela 3. Sintomas clínicos observados em suínos vacinados com bacterina de *H. parasuis* sorovar 5

| Sintomas clínicos | 1ª dose | 2ª dose | Total |
|--|---------|---------|-------|
| Vômitos | 14/32* | 17/32 | 31/64 |
| Pêlos arrepiados/ tremores musculares | 5/32 | 2/32 | 7/64 |
| Taquipnéia | 5/32 | 5/32 | 10/64 |
| Total | 24/32 | 24/32 | 48/64 |

* Número de suínos que apresentaram sintomas/ Número total de suínos

Todos os 32 animais do grupo A resistiram ao desafio, não apresentando quaisquer sinais clínicos de infecção ou doença. Trinta e um dos 32 animais não-vacinados morreram após o desafio e

apenas um sobreviveu, não apresentando qualquer sinal de doença, comportando-se como um animal saudável, ele foi novamente desafiado e voltou a repetir o quadro de total ausência de sinais clínicos. Segundo Trigo et al. (1996), em um experimento com 30 animais, somente 3 (10%) do grupo-controle não-vacinado morreram e outros 12 (40%) foram sacrificados pela intensidade das lesões. Os 31 suínos do grupo B apresentaram um quadro clínico em que se observou primeiramente a presença de vômito em seis animais. O primeiro caso de vômito ocorreu com 15h 30min e o último, 21h 30min p.i.. Os resultados obtidos por Morozumi et al. (1981) relataram a presença de vômito com 6h p.i. Dois animais que apresentaram vômitos morreram com menos de 24h p.i., outros dois com mais de 24h e os dois restantes com mais de 43h p.i. A morte dos animais ocorreu no intervalo 5h 40min a 25h após o início do sinal clínico de vômito.

Dificuldade respiratória, taquipnéia e respiração pela boca foram observadas em sete animais do grupo não-vacinado, semelhante aos resultados observados por Little & Harding (1971) e Morozumi et al. (1981). Dois animais morreram aos 40min e 1h 10min após verificado os sintomas respiratórios. Outros animais apresentaram um curso clínico mais longo, tendo um morrido 38h 30min após o início dos sintomas. Três animais apresentaram os sinais de dificuldade respiratória 15h p.i. e morreram 1h 10min, 2h 20min e 6h 55min após o início dos sinais respiratórios. O último animal a apresentar os sinais respiratórios manifestou o quadro 40h p.i. Segundo Trigo et al. (1996), na reprodução da doença o fator individual é fundamental. Riley et al. (1977) observaram que animais com infecção por *H. parasuis* podem morrer subitamente, com o mínimo de lesões macroscópicas que se caracterizam por edema pulmonar e excesso de fluido pleural, pericárdio e peritoneal. A septicemia por bactérias Gram negativas pode levar ao quadro de coagulação intravascular disseminada (Nordstoga & Fjølstad, 1967; Amano et al., 1994). Em um dos animais observou-se um quadro forte de poliartrite a partir de 48h p.i.

A temperatura corporal às 15h p.i., nos animais do grupo B variou de 41,1 a 41,8°C. Em geral todos os animais apresentaram quadro de letargia, depressão, anorexia e prostração. Estes resultados são semelhantes aos observados por Madsen (1984), Desrosiers et al. (1986), Morozumi et al. (1981), Nicolet (1992) e Trigo et al. (1996). Cianose nas extremidades, principalmente orelha, focinho e parte ventral do abdômen foi observada em todos os animais do grupo B. Alguns animais apresentaram também edema de orelha e pálpebras. Sinais semelhantes foram verificados por Madsen (1984) e Desrosiers et al., (1986). Segundo Madsen (1984), a inflamação da orelha é patognomônica para a doença de Glässer e foi vista em vários rebanhos acometidos. Em geral, 15h p.i. os animais recusavam-se a andar, mas quando o faziam demonstravam estar sentindo dores.

Os dados de sobrevivência e mortalidade obtidos entre animais vacinados e não-vacinados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Suínos mortos e sobreviventes entre os vacinados e não vacinados inoculados com *H. parasuis* sorovar 5

| | Vacinados | Não-vacinados | Total |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| Mortos | 0 | 31 | 31 |
| Sobreviventes | 32 | 1 | 33 |
| Total | 32 | 32 | 64 |

A análise pelo qui-quadrado com um grau de liberdade e $p < 99,99$ indicou $\chi^2 = 56,30$ corrigido por Yates, que é altamente significativo, mostrando forte associação da variável vacina com a proteção aos leitões desafiados.

O tempo decorrido entre a inoculação e a morte dos leitões do grupo B é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Número de animais mortos e freqüência acumulada em horas pós-inoculação de suínos não-vacinados e inoculados com *H. parasuis* sorovar 5

| Horas p.i. | Nº Mortos | Freqüência acumulada |
|------------|-----------|----------------------|
| <20 | 2 | 2 |
| 21-24 | 9 | 11 |
| 25-28 | 7 | 18 |
| 29-32 | 1 | 19 |
| 33-36 | 3 | 22 |
| 37-40 | 2 | 24 |
| 41-44 | 1 | 25 |
| 45-49 | 2 | 27 |
| 49-52 | 1 | 28 |
| 61-64 | 2 | 30 |
| >90 | 1 | 31 |
| Total | 31 | 31 |

O tempo médio p.i. para a morte dos suínos desafiados foi de 33h 26min \pm 15h 17min, mas 51,6% deles morreram entre 21 e 28h p.i. Dois suínos morreram às 60h 30min e 63h, respectivamente, e um terceiro foi sacrificado 91h p.i., por incompatibilidade com a vida e razões humanitárias. Estes últimos animais elevaram o período médio de horas p.i. para a ocorrência da morte. Mas, em geral, o tempo foi curto, caracterizando uma morte súbita. Dois suínos morreram com menos de 20h, isto é com 16 e 17h 30min p.i. Até 36h p.i. morreram 70,96% dos suínos, isto é, 22. Este tempo reduzido possivelmente está relacionado com a ativação da virulência do sorovar 5 após passagens seriadas em suínos e com o alto título do desafio. A morte com menos de 24h p.i. pode ter relação com um quadro de coagulação intravascular disseminada pela septicemia do *H. parasuis* (Amano et al., 1994). Casos de morte súbita em infecções por *H. parasuis* são relatados por Radostits et al., 1963; Little & Harding, 1971 e Abe et al., 1982.

Os leitões mortos foram necropsiados e lesões macroscópicas foram observadas principalmente naqueles que morreram após 24h. Quanto mais tempo o animal resistiu após o desafio, mais intensa foram as lesões ao nível de serosas, o que foi observado também por Vahle et al. (1995). As lesões caracterizaram-se por pericardite, pleurisia, pneumonia e artrite. Em alguns animais observou-se hidrotórax, hidropericárdio, hidroperitônio e edema subcutâneo, alterações também observadas por Madsen (1984), Desrosiers et al. (1986) e Trigo et al. (1996).

A Tabela 6 apresenta o número médio de colônias de *H. parasuis* isoladas dos espécimes clínicos dos animais do grupo B, desafiados com o serovar 5. A maior média de colônias isoladas de *H. parasuis* sorovar 5 foi da articulação tibio-társica, seguida do peritônio, da pleura, do pulmão e baço. Os dois animais que morreram entre 61-64h apresentaram o maior número médio de colônias isoladas, seguindo os de 25-28, depois os de 49-52, 33-36 e 45-48h. Nos animais que morreram com < 20h p.i. o pulmão foi o local de maior número de colônias isoladas. A presença de *H. parasuis* sorovar 5 no pulmão em contagens elevadas reforça a sua participação na morte dos suínos. Resultados semelhantes foram observados por Little & Harding (1971), Morozumi et al. (1981), Miniats et al. (1991) e Amano et al. (1994).

Os animais do grupo A não apresentaram quaisquer reações, tanto imediatas quanto tardias, que pudessem ser atribuídas ao desafio. Mantiveram-se alimentando todo o tempo p.i. e os movimentos respiratórios e a temperatura corporal mantiveram dentro dos padrões de normalidade para a idade (Straw & Meuten, 1992).

Tabela 6. Número médio de colônias isoladas de espécimes clínicos de suínos não-vacinados, mortos após desafio com *H. parasuis* sorovar 5

| Morte/p.i./h | Pulmão | Baço | Peritônio | Pleura | Articulação |
|--------------|--------|--------|-----------|--------|-------------|
| <20 | 213 | 4 | 17 | 4 | 3 |
| 21-24 | 9 | 38,72 | 30,3 | 15,66 | 113 |
| 25-28 | 18,57 | 132,57 | 89,57 | 43,57 | 183,85 |
| 29-32 | 2 | 21 | 7 | 6 | 1 |
| 33-36 | 35 | 92,66 | 31 | 102,66 | 203,66 |
| 37-40 | 30 | 10 | 41,5 | 45,5 | 35,5 |
| 41-44 | 0 | 2 | 14 | 75 | 28 |
| 45-48 | 27 | 19,5 | 150 | 165 | 72 |
| 49-52 | 18 | 146 | 300 | 12 | 57 |
| 61-64 | 82 | 98 | 189 | 196,5 | 150 |
| >90 | 12 | 10 | 72 | 43 | 121 |
| Total | 40,59 | 52,22 | 85,57 | 64,44 | 88,00 |

Dois dos 12 animais necropsiados aos 85 dias de idade apresentaram pericardite que atingiu todo o saco pericárdio. Os demais não apresentaram lesões macroscópicas visíveis. A presença de pericardite em dois leitões demonstra que a proteção da bacterina contra lesões foi parcial. Lesões de pericardite são consideradas típicas da infecção por *H. parasuis*. Considerando estes resultados, a proteção contra lesões seria de 30/32, isto é, de 93,75%. A cultura microbiológica dos materiais coletados dos 12 animais foi negativa para a presença de *H. parasuis* ou outros agentes bacterianos patogênicos para suínos. Resultados semelhantes foram observados por Barigazzi et al. (1994).

Os 20 suínos restantes do grupo A não apresentaram sinais clínicos ou reações indesejáveis, tanto imediata quanto tardia, que pudessem ser atribuídos ao segundo desafio ou doença no período posterior aos 118 dias de idade. Os animais alimentaram-se normalmente todo

o tempo observado e os movimentos respiratórios e a temperatura corporal mantiveram dentro dos padrões da idade. A necropsia dos 20 suínos do grupo A, aos 144 dias de idade, revelou ausência de lesões macroscópicas visíveis. A cultura microbiológica revelou ausência de bactérias patogênicas no pulmão, baço, peritônio, na pleura e articulação tíbio-társica nos animais do grupo A.

O sorovar 5 de *H. parasuis* é considerado o mais patogênico dos sorovares, responsável principal pela doença de Glässer. Ele tem uma participação de 10% nos sorovares isolados da suinocultura brasileira (Santos et al., 1997). A produção e avaliação da bacterina de *H. parasuis*, sorovar 5, em 32 suínos vacinados e 32 não-vacinados permitiu uma avaliação detalhada da eficiência da bacterina na proteção contra um alto desafio homólogo, o que foi confirmado na análise pelo χ^2 . Esta bacterina poderá ser utilizada na população suína para o controle das infecções por *H. parasuis*, que tem aumentado a sua participação como doença importante na suinocultura brasileira.

4.4 CONCLUSÕES

A bacterina *H. parasuis* sorovar 5 protegeu leitões contra o desafio homólogo, evitando a morte e os sinais clínicos da doença de Glässer e não induziu reações indesejáveis que interferissem no desenvolvimento dos animais vacinados. O título de 10^9 UFC de *H. parasuis* sorovar 5 é capaz de reproduzir a doença de Glässer em suínos de 60-70 dias de idade por via intratraqueal

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T., IWASAKI, M., YOSHIKAWA, Y. et al. Na outbreak of Glässer's disease due to *Haemophilus parasuis* in piglets. **Bull. Natl. Inst. Anim. Health**, v.22, n.4, p.182, 1982.
- AMANO, H., SHIBATA, M., KAJIO, N. et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. **J. Vet. Med. Sci.**, v.56, n.4, p. 639-644, 1994.
- 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)
- BARIGAZZI, G., VALENZA, F., BOLLO, E. et al. Anatomohistopathological features related to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, **Proceedings...** Bangkok, IPVS. 1994. p.235
- 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. Glässer's disease: A clinical case report. In: CONGRESS AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 26, 1995. **Proceedings...** Omaha, AASP, 1995. p. 211-215
- CARTER, G.R. & COLE, J.R. (ed). **Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology**. 5. ed. New York, Academic Press, 1990. 620 p.
- CLARK, L.K. Sew: program, problems, performance, potential profits and methods of implementation for various herd sizes. In: GEORGE A YOUNG SWINE CONFERENCE, 1995, Concord. Concord: University of Nebraska, 1995. P.1-14.
- 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
- DESROSIERS, R., PHANEUF, J.B., BROES, A. et al. An outbreak of atypical Glässer's disease in Quebec. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 9, 1986, **Proceedings...** Barcelona, IPVS, 1986. p.277
-

- 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.
- HAEMOPHILUS *parasuis*, part 1. **Agri-Pract**, v.14, n.3, p.19-23, 1993.
- LITTLE, T.W.A & HARDING, J.D.J. The comparative pathogenicity of two porcine *Haemophilus* species. **Vet. Rec.**, v.88, n.21, p.540-545, 1971.
- 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
- MINIATS, O P., SMART, N.L., EWERT, E. Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, n.1, p.33-36, 1991.
- MINIATS, O P., SMART, N.L., ROSENDAL, S. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, n.1, p.37-41, 1991.
- 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., KOBAYASHI, K. Glässer's disease in piglets produced by intraperitoneal inoculation with *Haemophilus parasuis*. **Natl. Inst. Anim. Health. Q.**, v.21, n.3, p.121-128, 1981.
- 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.
- 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
- NORDSTOGA, K., & FJØLSTAD, M. The generalized Schwartzman reaction and *Haemophilus* infections in pigs. **Path. Vet.**, v. 4, n. 3, p 245-253, 1967.
- PÖHLE, D., JOHANNSEN, U., KIELSTEIN, P. et al. Investigations on pathology and pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection of swine. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 12, 1992, **Proceedings...** Hague, IPVS, 1992. p.335
-

- RADOSTITS, O M., LOUISE RUHNKE, H., LOSOS, G.J. Na outbreak of meningitis in swine caused by *Haemophilus* species of bacterium. **Can. Vet. J.**, v.4, n.10, p.265-270, 1963.
- RAPP-GABRIELSON, V.J., KOCUR, G.J., MUIR, S.K. et al. Cross-protection following vaccination of swine with different serovars of *Haemophilus parasuis*, In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, **Proceedings...** Bangkok, IPVS, 1994. p.157.
- RIISING, H.J. Prevention of Glässer's disease through immunity to *Haemophilus parasuis*. **Zentralb. Vet. Med. B.**, v.28, n.2, p.630-638, 1981.
- RILEY, M.G.I., RUSSELL, E.G., CALLINAN, R.B. *Haemophilus parasuis* infection in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.171, n.7. p.649-651, 1977.
- SANTOS, J.L. **Epidemiologia e controle da infecção por *Haemophilus parasuis***. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 1997. 137p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Cap. 2 Frequência de *Haemophilus parasuis* no Brasil. p.21-50.
- SMART, N.L., HURNIK, D., MACINNES, J.I. An investigation of enzootic Glässer's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **Can. Vet. J.**, v.34, n.8, p.478-490, 1993.
- SMITH, I.M. & BASKERVILLE, A J. A selective medium for the isolation of *P. multocida* in nasal specimes from pigs. **Br. Vet. J.**, v.139, n.6, p.476-486, 1979.
-

- SOBESTIANSKY, I., MORES, N., LIEBHOLD, M.M. et al.
Doença de Glässer: Uma doença pouco conhecida no Brasil.
Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1988. 4p. (EMBRAPA-
CNPSA. Comunicado Técnico, 137)
- STRAW, B.E. & MEUTEN, D.J. Physical Examination, In:
LEMAN, A.D. (ed). **Disease of swine**. 7. ed. Ames; Iowa State
University, 1992, p.793-807.
- TRIGO, E., REESE, L., SIMONSON, R. Efficacy of a
Haemophilus parasuis commercial bacterin. The serological
response in vaccinated pigs. In: CONGRESS
INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996,
Proceedings... Bologna, IPVS, 1996. p.321
- VAHLE, J.L., HAYNES, J.S., ANDREWS, J.J. Experimental
reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine:
clinical, bacteriologic, and morphologic findings. **J. Vet. Diag.
Invest.**, v.7, n.4, p.476-480. 1995.
- van den BOSCH, J.F., PENNINGS, A.M.M.A, CUIJPERS,
M.E.C.M. et al. Heterologous protection induced by a *A
pleuropneumoniae* subunit vaccine. In: CONGRESS
INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 11, 1990,
Proceedings... Lausanne, IPVS, 1990. p.11
-

CAPITULO 5

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA
TRIVALENTE DE *HAEMOPHILUS PARASUIS***

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA BACTERINA TRIVALENTE DE *HAEMOPHILUS PARASUIS*

5.1 INTRODUÇÃO

O uso de vacinas capazes de proteger contra diversas doenças e sorovariedades sempre foi um dos objetivos da indústria farmacêutica e um sonho dos produtores, pois facilitaria uma série de medidas de manejo, traduzindo-se, ao final, em ganho financeiro. A vacinação contra determinada enfermidade, na qual o seu agente etiológico possui mais de um sorovar, pode terminar em fracasso, não atingindo o objetivo de controlar a doença, culpando-se então a qualidade da vacina por esta falha, o que nem sempre é verdadeiro.

A principal fonte de contaminação de uma granja de suínos é a introdução de animais, por isto a tendência atual é manter as granjas fechadas, impedindo assim a entrada de agentes etiológicos de doenças graves. Para atingir estes objetivos foram desenvolvidos sistemas de criação apropriados e denominados de Isowean® (Harris, 1988) ou Desmama precoce segregada (Connor, 1990). Estes sistemas permitem que a granja elimine os principais patógenos existentes na suinocultura atual, conseqüentemente os animais não adquirem imunidade por exposição, sendo altamente susceptíveis à ação dos microorganismos patogênicos para suínos (Solano et al., 1996). Um dos agentes que não é eliminado nestes sistemas é *Haemophilus parasuis* (Clark, 1995).

H. parasuis é o agente etiológico da doença de Glässer, que se caracteriza pela presença de polisserosite fibrinosa e artrite. Atualmente são conhecidos 15 sorovariedades de *H. parasuis*

(Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992). Algumas propriedades podem estar contaminadas por mais de um sorovar (Smart et al., 1988; Santos et al., 1997). O uso de bacterinas monovalentes nestas propriedades pode não atingir os resultados esperados, possivelmente por falha no processo de proteção cruzada (Miniats et al., 1991; Smart et al., 1993).

Uma bacterina mista de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *H. parasuis*, sorovares 4 e 5, foi desenvolvida e avaliada por Rapp-Gabrielson et al. (1996) e conferiu proteção contra os sorovares 4, 5, 12 e 13, mas nenhum resultado contra os sorovares 2 e 14. No Brasil não existem estudos de proteção heteróloga ou cruzada contra sorovares de *H. parasuis*. Os sorovares 1, 4, 5 e 12 são os mais frequentes no Brasil, segundo Santos et al. (1997), que observaram ainda, em 28,9% das explorações de manejo tradicional estudadas, a presença de mais de um sorovar, e em algumas foram detectados seis ou até mesmo sete sorovares diferentes. Estes resultados dão a extensão na dificuldade do controle da infecção por *H. parasuis*, somado a inexistência de vacinas no País. Uma vacina contendo os sorovares 1, 4 e 5, considerados patogênicos (Nicolet, 1992; Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992) e mais frequentes no Brasil, poderia conferir proteção a 36% da população suína, mas caso haja proteção heteróloga este percentual poderá aumentar. O sorovar 6 é considerado avirulento (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992) e, a princípio, incapaz de reproduzir quadro clínico em animais desafiados, mas espera-se que após a passagem seriada em suínos susceptíveis ele será capaz de provocar o quadro da doença de Glässer.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a proteção homóloga e heteróloga conferida por uma bacterina trivalente de *H. parasuis*

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Ativação da virulência dos sorovares 1 (nº 4), 4 (SW 124) e 6 (H425) de *H. parasuis*

Procedimentos adotados na ativação da virulência do *Haemophilus parasuis* sorovar cinco (Nagazaki) (Santos et al., 1997) foram seguidos para 'ativação' da virulência dos *H. parasuis* sorovares 1, 4 e 6¹.

Quinze leitões, de 50 dias, oriundos de rebanho de 'doença mínima' livre de *H. parasuis*, foram divididos em três grupos de cinco leitões e utilizados para 'ativar' a virulência dos sorovares 1, 4 e 6 de *H. parasuis*, respectivamente. Cada suíno foi desafiado por via intratraqueal, com quatro mililitros das suspensões bacterianas, com a ajuda de um trocater (2x50mm) e uma sonda endotraqueal² (1,7 x 203mm). Os primeiros suínos foram inoculados com as doses de $1,8 \times 10^{10}$, $3,5 \times 10^{10}$ e $4,2 \times 10^{10}$ UFC/mL, respectivamente dos sorovares 1, 4 e 6. Estes suínos foram sacrificados e necropsiados após apresentação dos sinais clínicos ou morte em até quatro dias após a inoculação. Foram coletados espécimes clínicos do pulmão, da pleura, do peritônio, pericárdio, da traquéia, do baço e líquido sinovial da articulação tíbio-társica para cultura segundo Møller & Killian (1990) e Gutierrez et al. (1993). Os materiais foram semeados em ágar sangue³ com estria de *Staphylococcus aureus* e

¹ Gentilmente cedido pelo Dr. P. Kielstein. Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes. Jena. Alemanha

² Intracath - Becton Dickinson. Sandy - UT. EUA

³ Difco Laboratories. Detroit - MI. EUA

ágar PPLO³ S (Pleuropneumoniae-like organism, suplementado com 5% de soro de coelho, 0,004% de NAD⁴ -β nicotinamida adenina dinucleotídeo). As amostras de *H. parasuis* recuperadas dos espécimes clínicos e confirmadas como sorovares 1, 4 ou 6, respectivamente, foram utilizadas nas inoculações do segundo grupo de animal, de modo semelhante ao primeiro, e assim sucessivamente até completar o quinto animal para cada sorovar. Os títulos de UFC/mL para a segunda, terceira, quarta e quinta inoculações, constam na tabela 1. *H. parasuis* isolados dos suínos da quinta inoculação seriada foram confirmados como sorovares 1, 4 e 6 e liofilizados.

Preparo da bacterina trivalente

Os sorovares 1 e 4 de *H. parasuis* recuperados dos suínos e liofilizados, juntamente com o sorovar 5 (Nagazaki) de *H. parasuis*, este empregado em um experimento de avaliação da bacterina homóloga (Santos et al. 1997), foram utilizados na preparação da bacterina trivalente. Os procedimentos adotados individualmente para cada sorovar foram semelhantes àqueles utilizados na preparação da bacterina monovalente (Santos et al., 1997). A bacterina consistiu de uma mistura de 80% da suspensão (partes iguais dos três sorovares) e 20% de adjuvante oleoso⁵. O título de cada sorovar foi padronizado em $1,0 \times 10^9$ UFC por mL. O teste de inocuidade foi realizado em 10 camundongos de 21 dias e em dois suínos de 50 dias, estes oriundos de rebanho de 'doença mínima'. Os camundongos foram inoculados com 0,2 mL pela via intraperitoneal e os suínos com 2,0 mL pela via intramuscular, observados por 10 dias quanto à presença de reações indesejáveis.

Grupos Experimentais

⁴ Sigma Chemical Company. St. Louis - MO. EUA

⁵ Emulsingen®. MVP Laboratories. - NE. EUA

Cinquenta e um leitões, identificados ao nascimento, não-emascuados, de 21 dias de idade, oriundos da granja de 'doença mínima', considerada livre de *H. parasuis*, foram divididos ao acaso em três grupos, C, D e E, de 17 leitões. Os suínos de cada grupo foram alojados em três baias com quatro animais, uma baia com dois e uma controle, com três animais. O galpão de creche foi previamente lavado e desinfetado. A temperatura ambiente foi ajustada para $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O arraçamento consistiu em ração pré-inicial até 35 dias de idade, ração inicial I até 49 dias, ração inicial II até 70 dias, ração recria até 110 dias e ração terminação até o final. Todas as rações eram livres de antibióticos ou promotores de crescimento. Aos 70 dias de idade, os leitões foram transferidos para o galpão de recria. Cada grupo ocupou uma única baia do galpão. Foram coletadas zaragatoas nasais de todos os leitões aos 36, 56 e 73 dias de idade e cultivadas em ágar PPLO S, ágar sangue e ágar G20G (Smith & Baskerville, 1979), com atenção especial ao isolamento de *H. parasuis*. Adotou-se procedimentos recomendados por Carter & Cole (1990) para o isolamento e a identificação de patógenos bacterianos do trato respiratório de suínos. Os animais foram pesados aos 36, 73 e 118 dias de idade.

Vacinação

Quatorze leitões de cada grupo foram vacinados com a bacterina trivalente, contendo os sorovares 1, 4 e 5, aos 36 e 56 dias de idade, pela via intramuscular, nas doses de 2,0 e 3,0 mL, respectivamente. Três animais de cada grupo permaneceram como controle, não-vacinados, numa mesma baia da creche. Os animais foram observados por 10 dias quanto às reações indesejáveis.

Desafio Homólogo e Heterólogo

Aos 74 dias de idade, todos os leitões, inclusive os não-vacinados, foram desafiados por via intratraqueal com ajuda de um trocater e

uma sonda endotraqueal. Os leitões do grupo C foram desafiados com o sorovar 1, na dose de 4,0 mL de $1,3 \times 10^9$ UFC/mL; os do grupo D, com sorovar 5, na dose de 4,0 mL de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL e os do grupo E, com sorovar 6, na dose de 4,0 mL de $2,0 \times 10^9$ UFC/mL. As culturas foram lavadas em PBS pH 7,2 e centrifugadas a $8.000 \times g$, por duas vezes, antes de serem padronizadas pela comparação visual com o tubo 9 da escala de MacFarland. Os animais foram observados durante o dia e parte da noite quanto a sinais clínicos. Os que morreram foram necropsiados e coletou-se material do pulmão, da pleura, do peritônio, pericárdio, da traquéia, do baço e líquido sinovial da articulação tíbio-társica para cultura microbiológica em ágar PPLO S, ágar sangue de carneiro e ágar G20G, dando-se atenção especial ao isolamento do *H. parasuis* e a outros patógenos do trato respiratório de suínos, segundo Carter & Cole (1990).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ativação da virulência do *Haemophilus parasuis* sorovares 1 (nº 4), 4 (sw 124) e 6 (H 425)

Os resultados da 'ativação' da virulência dos *H. parasuis* sorovares 1 (nº 4), 4 (sw 124) e 6 (H 425) pela passagem seriada em suínos são apresentados na tabela 1. O primeiro suíno inoculado com o sorovar 6 teve tosse a partir do terceiro dia após inoculação (p.i.). Os primeiros suínos inoculados com o sorovar 1 e sorovar 4 apresentaram aumento da articulação tibio-társica a partir do terceiro dia p.i. Todos os três suínos foram sacrificados ao final do quarto dia p.i., quando não se constataram outras lesões macroscópicas. *H. parasuis* foi isolado da traquéia do suíno inoculado com o sorovar 6 e da articulação tibio-társica dos suínos inoculados com os sorovares 1 e 4. O suíno da segunda inoculação com o sorovar 1 morreu 48h p.i., e os inoculados com o sorovar 4 e sorovar 6 morreram com 50 e 56h p.i., respectivamente. As lesões macroscópicas caracterizaram-se por pleurisia, peritonite, pericardite, esta no animal inoculado com o sorovar 1. Os suínos da terceira inoculação com sorovar 1, sorovar 4 e sorovar 6 morreram com 44, 46 e 48h p.i., respectivamente. O quadro de lesões macroscópicas caracterizou-se pela presença de fibrina definindo um quadro de pleurisia, pericardite e peritonite. Os suínos da quarta inoculação com sorovares 1, 4 e 6 morreram 36, 48 e 46h p.i., respectivamente. O quadro de lesões macroscópicas foi semelhante ao dos animais do inóculo anterior. Após a quinta inoculação, os suínos morreram 29, 33 e 31h p.i., respectivamente para os sorovares 1, 4 e 6. Apresentaram à necropsia presença de fibrina nas serosas, caracterizando um quadro de intensa pleurisia, pericardite

e peritonite. Resultados semelhantes foram observados por Morozumi et al. (1981), Miniats et al. (1991), Amano et al. (1994) e Vahle et al. (1995).

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 *H. parasuis*

| Suínos | Inóculos UFC/mL | | | Morte em horas p.i. | | |
|--------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------|------|
| | SV 1 | SV 4 | SV 6 | SV 1 | SV 4 | SV 6 |
| 1º | 1,8x10 ¹⁰ | 3,5x10 ¹⁰ | 4,2x10 ¹⁰ | >96 | >96 | >96 |
| 2º | 1,4x10 ¹⁰ | 2,1x10 ¹⁰ | 2,3x10 ¹⁰ | 48 | 50 | 56 |
| 3º | 1,2x10 ¹⁰ | 1,3x10 ¹⁰ | 1,1x10 ¹⁰ | 44 | 46 | 48 |
| 4º | 1,7x10 ¹⁰ | 2,1x10 ¹⁰ | 1,4x10 ¹⁰ | 36 | 48 | 46 |
| 5º | 2,08x10 ¹⁰ | 1,8x10 ¹⁰ | 1,5x10 ¹⁰ | 29 | 33 | 31 |

H. parasuis foi isolado somente da articulação tíbio-társica do primeiro suíno inoculado com os sorovares 1, 4 e 6. Nas passagens subsequentes, isolou-se *H. parasuis* pleura, peritônio, pericárdio, pulmão, baço e articulação tíbio-társica de todos os animais inoculados, respectivamente, com os sorovares 1, 4 e 6. As amostras de *H. parasuis* recuperados dos suínos inoculados apresentaram classificação sorológica condizente com os sorovares inoculados.

A dose do inóculo usado para se obter a infecção foi elevada, pois em tentativas anteriores, com dosagens menores, não se conseguiu reproduzir o quadro clínico e nem foi possível o isolamento do *H. parasuis* dos animais inoculados. O sorovar 1 (Nº 4) foi usado por Morozumi et al. (1981) para um desafio experimental em três suínos SPF, por via intraperitoneal, na dosagem de $1,6 \times 10^8$ UFC em quatro mililitros e observaram que um suíno apresentou quadro de febre persistente e edema nas articulações, tendo sido sacrificado no terceiro dia, os outros suínos, somente no sexto dia. Com a dosagem de 1×10^9 UFC em quatro mililitros de *H. parasuis*

sorovar 1, dois entre quatro suínos morreram no segundo e terceiro dias após inoculação, apresentando quadro típico da doença. Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) utilizaram 5×10^8 UFC/mL como dose de desafio em leitões SPF de 6kg p.v. para avaliar a virulência dos sorovares de *H. parasuis* e observaram ampla variação quanto à patogenicidade dos sorovares. Peet et al., (1983) desafiaram três suínos SPF de oito semanas de idade, com 10^8 UFC/mL de *H. parasuis* isolado de um surto de campo e observaram que nenhum dos animais adoeceu e que na necropsia, 10 dias p.i, não se constatou qualquer lesão macroscópica. A dose de 4×10^{10} UFC de uma amostra de *H. parasuis* isolada de doença de Glässer foi usada por Rosendal et al. (1985) para reproduzir o quadro, com evolução para a morte em 48h. A dose de 5mL de uma cultura de 3×10^9 UFC/mL dos sorovares 13 e 14 foi usada pela via intranasal, por Barigazzi et al. (1994), para reproduzir a doença em suínos de seis semanas de idade, obtendo-se somente ligeiro aumento da temperatura no primeiro dia pós infecção. Amano et al. (1994) observaram resultados parciais na inoculação de suínos com os sorovares 1, 4 e 5 de *H. parasuis*, onde somente um dos seis suínos desafiados com o sorovar 4 morreu após o desafio. Os resultados constantes na tabela 1 indicam que uma dosagem alta é garantia de reprodução do quadro de doença de Glässer a partir de amostras mantidas em laboratórios por muito tempo ou muitas passagens. Títulos menores do que os usados na inoculação para ativação da virulência poderiam incorrer em falhas na reprodução do quadro clínico, e até se obter o título ideal do inóculo teria que fazer uso de um número maior de suínos SPF que não estava disponível. Os resultados sugerem a necessidade de determinar previamente o título do inóculo a ser usado no desafio de suínos para efeito de avaliação da proteção de bacterina, e da "ativação" por passagem seriada em suínos das amostras que estão estocadas em laboratório por mais de 10 anos, como é o caso do sorovar 1.

A cultura individualizada em ágar PPLO S dos sorovares 1, 4 e 5 (Nagazaki) de *H. parasuis* recuperados dos suínos revelou, após

16h, um crescimento uniforme de colônias circulares, translúcidas, de 1mm de diâmetro. O teste de esterilidade da massa bacteriana em agar PPLO S e tioglicolato de Brewer foi negativo para o crescimento de qualquer agente bacteriano pelo período de 48h e sete dias, respectivamente. Os camundongos inoculados não apresentaram sinais clínicos após a inoculação da bacterina. Dois suínos apresentaram vômitos, pêlos arrepiados e tremores musculares 30min após a inoculação, mas esses sinais desapareceram nos próximos 60min. Não foram observadas outras reações locais ou sistêmicas nos suínos nos 10 dias seguintes à vacinação.

Os resultados da cultura das secreções nasais dos leitões aos 36, 56 e 73 dias de idade constam na Tabela 2. *Streptococcus* sp foi o principal agente bacteriano isolado aos 36 e 56 dias de idade. Nestes isolamentos observou-se que ele predominava ou era o único agente presente na cultura, mas em ambos os casos havia um número superior a 100 colônias por placa. Aos 73 dias de idade, a participação de *Bordetella bronchiseptica* foi em 19,6% dos suínos. O predomínio nas culturas das secreções nasais aos 36, 56 e 73 dias de idade foi da flora mista, com ausência de bactérias potencialmente patogênicas, incluindo-se nestas o *H. parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida*. Estes resultados confirmam o padrão sanitário dos animais utilizados na avaliação da bacterina trivalente de *H. parasuis*, mas a detecção de *Streptococcus* sp e de *B. bronchiseptica* reforçam a hipótese de que estes agentes, principalmente *Streptococcus* sp, não são eliminados (Dritz et al., 1996) pelo processo de desmama precoce medicada, assim podem ser responsáveis pela 'quebra' da biossegurança do esquema de manejo sanitário de granjas de alto padrão sanitário, juntamente com o *H. parasuis* (Madsen, 1984).

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 *H. parasuis*

| Agentes Bacterianos | 36 dias n°(%) | 56 dias n°(%) | 73 dias n°(%) | Total |
|---|------------------|------------------|------------------|-------|
| <i>Streptococcus</i> sp | 12(23,52) | 15(29,41) | 0 | 27 |
| <i>Streptococcus</i> sp + <i>E. coli</i> | 8(15,62) | 4(7,84) | 0 | 12 |
| <i>B. bronchiseptica</i> | 0 | 1(1,96) | 10(19,6) | 11 |
| Flora mista - ausência de patógenos | 31/60,78 | 30(58,82) | 40(78,43) | 42 |
| <i>Streptococcus</i> sp - <i>Staphylococcus</i> sp | 0 | 1(1,96) | 1(1,96) | 2 |

O peso médio dos leitões (Tabela 3) aos 21 dias de idade foi de $6,63 \pm 1,39$ kg e aos 73 dias de $35,45 \pm 4,99$ kg, com 485g de ganho de peso diário (GPD). Aos 118 dias, o peso médio foi de $77,72 \pm 8,75$ kg, com 658g de GPD. O peso à desmama está dentro do esperado (Straw & Meuten, 1992) para suínos, principalmente tendo em vista a época do ano, inverno, quando as porcas produzem mais leite, e pelo fato de serem leitões machos não-emasculados. Os pesos médios e os ganhos de peso diário refletem o padrão sanitário dos animais, sugerindo a ausência de infecção e semelhanças aos resultados obtidos por Clark (1995), que acompanhou, semanalmente, o desempenho de suínos de alto padrão sanitário do desmame ao abate com 144 dias de idade.

Tabela 3. Peso médio dos suínos vacinados com bacterina trivalente de *H. parasuis* e desafiados com sorovares 1, 5 e 6

| | 21 dias | 73 dias | 118 dias |
|-----------|-----------|------------|------------|
| Peso (kg) | 6,63±1,39 | 35,45±4,99 | 77,72±8,75 |
| GPD* (kg) | 0,315 | 0,485 | 0,658 |

* GPD = Ganho de peso diário

A Tabela 4 apresenta as reações observadas na vacinação. Oito leitões apresentaram tremores musculares 30min após a inoculação da primeira dose da vacina, aos 36 dias de idade, e quatro apresentaram vômitos. Após a segunda dose da vacina, aos 56 dias de idade, três animais tiveram tremores musculares e outros três apresentaram vômitos, que iniciaram em torno de 30min e persistiram no máximo por mais 60min. Os 12 animais que reagiram à primeira dose da bacterina representam 28,6%, e os seis que reagiram à segunda dose, 14,3%. Os suínos que apresentaram reações à vacinação permaneceram por oito a 12h, aproximadamente, em estado de sonolência. Decorrido este tempo, voltaram a apresentar um comportamento normal. Os sintomas sugerem a presença de substâncias tóxicas na bacterina, em concentração menor do que na vacina monovalente (Santos et al., 1997), possivelmente pela menor concentração em um dos três sorovares utilizados na preparação da bacterina.

Tabela 4. Número de suínos que apresentaram reações à vacinação com bacterina trivalente de *H. parasuis*

| | 1ª dose/% | 2ª dose/% | Total/% |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| Tremores musculares | 8 (19,0) | 3 (7,1) | 11 (13,1) |
| Vômitos | 4 (9,5) | 3 (7,1) | 7 (8,3) |
| Total | 12 (28,6) | 6 (14,3) | 18 (21,4) |

O fato de a massa bacteriana ter sido lavada para o preparo da bacterina trivalente pode ter contribuído também na redução das reações imediatas à bacterina, pela eliminação de parte de toxinas, possivelmente lipopolissacárides. O maior peso dos suínos, quando na aplicação da segunda dose da vacina, pode ter agido como fator diluidor, contribuindo para a redução das reações à vacina. Não foram observadas outras reações locais ou sistêmicas que pudessem ser atribuídas à bacterina nos 10 dias seguintes à vacinação.

Os resultados dos desafios homólogo e heterólogo foram semelhantes, tendo em vista que os três animais não-vacinados de cada grupo, C, D e E, morreram após desenvolvimento de sintomatologia clínica condizente com o quadro da doença de Glässer. Os animais vacinados dos grupos C e D resistiram ao desafio homólogo e os do grupo E, ao desafio heterólogo. Os sinais clínicos manifestaram-se nos animais não-vacinados dos grupos C, D e E a partir de 15h p.i. e caracterizaram por cianose ou coloração púrpura das extremidades, principalmente no focinho, na orelha, região ventral do tórax e abdômen, além de nas extremidades dos membros, indicando alterações circulatórias, possivelmente por um mecanismo de coagulação intravascular disseminada pela septicemia do *H. parasuis* (Nordstoga & Fjølstad, 1967 e Amano et al., 1994). Os outros sinais clínicos foram dificuldade respiratória, depressão, anorexia, letargia e prostração. Resultados semelhantes foram observados por Riley et al. (1977), Morozumi et al. (1981), Abe et al. (1982), Miniats et al. (1991) e Trigo et al. (1996). Não foram verificadas reações de vômito e tremores musculares indicando uma possível reação alérgica.

O tempo médio de ocorrência da morte p.i. foi de 49, 58 e 41h, respectivamente, para os sorovares 1, 5 e 6. O tempo médio p.i. para o sorovar 5 foi maior do que para os demais, porque um suíno do grupo D morreu após 96h p.i. Caso contrário, o tempo médio para a ocorrência da morte estaria dentro de um prazo inferior a 40h p.i. O tempo entre o desafio e a morte foi pequeno, indicando

virulência e dose alta dos sorovares usados no desafio. Estes resultados foram semelhantes àqueles observados por Radostits et al. (1963), Little & Harding (1971), Riley et al. (1977), Madsen (1984) e Desrosiers et al. (1986), que relataram casos de campo com morte súbita em rebanhos de alto padrão sanitário. Riley et al. (1977) inocularam, experimentalmente, 10 leitões de 15 kg p.v. e somente um deles apresentou o quadro de doença de Glässer, cinco outros não apresentaram quadro clínico, inclusive ausência ou ligeira febre. Miniats et al. (1991) observaram que os suínos do grupo-controle, ao serem desafiados, evoluíram para a morte somente a partir do terceiro dia. Vahle et al. (1996) observaram mortes em 12, 36, 84 e 108h p.i. quando usaram uma dose de desafio de 2×10^9 UFC. Este desafio pode se aproximar do que acontece em casos de campo, onde uma amostra de *H. parasuis*, ao passar de animal para animal, aumenta sua virulência, produzindo casos de morte súbita. É importante mencionar que o sorovar 6 (H425), considerado avirulento por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992), induziu à morte em menor tempo (4lh) do que os sorovares 1 e 5, considerados de alta virulência. Isto em animais de alto padrão sanitário, com 74 dias de idade e pesando 35,45kg em média. Supõe-se que ao fazer a classificação de alguns sorovares como avirulentos deve-se ter em conta o manejo da propriedade, o padrão sanitário dos animais, a exposição natural entre os animais contribuindo para o desenvolvimento da imunidade e a idade e o peso dos suínos. As observações de Rapp-Gabrielson et al (1996) não relataram a dose de desafio ou se ocorreu morte quando desafiaram os animais vacinados contra sorovares 4 e 5, dificultando, desta forma, uma possível comparação. A reprodução experimental da doença de Glässer é difícil e várias tentativas (Riley et al., 1977; Morozumi et al., 1981; Barigazzi et al., 1994 e Amano et al., 1996) já foram feitas e não se conseguiu o quadro típico, mesmo utilizando-se de amostras de campo que tinham sido responsáveis por quadros da doença de Glässer.

A Tabela 5 apresenta o resultado do desafio nos lotes vacinados e não-vacinados com a bacterina trivalente de *H. parasuis*

Todos os suínos não-vacinados morreram, indicando a efetividade do desafio e, por conseguinte, a capacidade da bacterina trivalente com os sorovares 1, 4 e 5 de induzir

Tabela 5. Mortalidade de suínos vacinados ou não com bacterina trivalente e desafiados com *H. parasuis* sorovares 1, 5 e 6

| | Sorovares | | |
|---------------|-----------|-------|-------|
| | 1 | 5 | 6 |
| Não-vacinados | 3/3* | 3/3* | 3/3* |
| Vacinados | 0/14* | 0/14* | 0/14* |

*número de mortos/total de animais

proteção contra desafio homólogo com os sorovares 1 e 5 e heterólogo com o sorovar 6, em suínos de 74 dias de idade.

O número médio de colônias de *H. parasuis* isoladas dos suínos mortos pelo desafio com os diversos sorovares consta na tabela 6.

Tabela 6. Número médio de colônias de *H. parasuis* isoladas dos suínos não vacinados e mortos pelo desafio com os sorovares 1, 5 e 6.

| Sorovares | Articulação | Pericárdio | Peritônio | Pleura | Traquéia |
|-----------|-------------|------------|-----------|--------|----------|
| 1 | 1 | 150 | 213 | 243 | 300 |
| 5 | 15 | 206 | 135 | 204 | 300 |
| 6 | 100 | 218 | 200 | 257 | 300 |

O maior número de colônias isoladas foi da traquéia nos suínos dos grupos C, D e E não-vacinados. Contrariando o experimento com a vacina homóloga (Santos et al., 1997), o isolamento na articulação

tíbio-társica foi muito baixo. Não se isolou *H. parasuis* do pulmão e do baço. A presença de alta contagem de *H. parasuis* nos diversos espécimes clínicos onde se pesquisou sua presença indicam uma bacteremia após desafio, o que já foi relatado por Amano et al. (1994), e pode-se supor a participação do *H. parasuis* na morte dos animais não-vacinados. Riley et al. (1977) somente obtiveram isolamentos em dois de 10 suínos desafiados, Barigazzi et al. (1994) relataram sucesso parcial na reprodução da doença em suínos de seis semanas e *H. parasuis* foi isolado somente nas tonsilas e do pulmão.

Os animais vacinados não apresentaram quaisquer sinais clínicos p.i., tanto imediatos quanto tardios, que pudessem ser atribuídos ao desafio ou a uma possível infecção com *H. parasuis*, por um período de até 10 dias p.i. Resultados semelhantes foram observados por Smart & Miniats (1989) e Miniats et al. (1991). Rapp-Gabrielson et al. (1996) utilizaram uma bacterina contendo *M. hyopneumoniae* e os sorovares 4 e 5 de *H. parasuis*. Eles observaram proteção contra os sorovares 4, 5 e 12, proteção parcial contra o sorovar 13 e não houve proteção contra os sorovares 2 e 14, mesmo sendo o sorovar 2 reconhecido por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) como de média virulência.

Os suínos vacinados foram sacrificados aos 118 dias de idade. No decorrer deste período foram acompanhados clinicamente para presença de doença ou qualquer sinal indicativo de envolvimento de *H. parasuis*, como artrite, tosse, espirro, respiração abdominal e febre. Os suínos alimentaram-se normalmente no período p.i. No exame dos 42 suínos necropsiados não foram observadas alterações macroscópicas. A cultura microbiológica de espécimes coletados da pleura, peritônio, baço, articulação tíbio-társica não permitiu o isolamento de agentes bacterianos patogênicos para suínos, em especial de *H. parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *B. bronchiseptica*. Resultados semelhantes

foram observados por Smart & Miniats (1989), Miniats et al. (1991), e Trigo et al. (1996).

O controle das doenças respiratórias pneumonia enzoótica, pleuropneumonia suína e rinite atrófica progressiva, consideradas as mais importantes economicamente, abriu espaço para as infecções por *H. parasuis*, que passou a ocupar uma posição de destaque na suinocultura brasileira. Estes acontecimentos deram-se muito rápido, e a suinocultura do País já estava alertada para o despreparado (Sobestiansky et al., 1988) para se conviver com a doença e não dispunha de meios para o controle da doença de Glässer. A demonstração da eficácia de uma bacterina trivalente de *H. parasuis*, contendo os três principais sorovares mais freqüentes no Brasil, é um passo importante no controle desta doença, que tem causado prejuízos econômicos na suinocultura brasileira, quer seja aquela que adota o manejo tradicional, quer aquela que utiliza os sistemas de criação em três sítios ou o Isowean.

A bacterina trivalente de *H. parasuis* contendo os sorovares 1, 4 e 5 protegeu 100% dos animais contra os desafios com os sorovares homólogos 1 e 5 e contra o sorovar heterólogo 6, indicando que seu uso poderá ser útil à suinocultura brasileira, pois os sorovares 1, 4 e 5 são, juntamente com o 12, os mais freqüentemente isolados de suínos doentes. Os resultados relatados por Rapp-Gabrielson et al. (1996) indicam que uma bacterina com os sorovares 4 e 5 apresentou proteção cruzada com os sorovares 12 e 13, mas não contra os sorovares 2 e 14, indicando que a bacterina aqui produzida poderá proteger também contra o sorovar 12, cobrindo um percentual de 51 % (Santos et al., 1997) da população.

O sorovar 6 (H.425) de *H. parasuis*, considerado avirulento após passagem seriada em suínos, foi capaz de reproduzir o quadro de doença de Glässer, levando os suínos à morte em 41h, após uma bacteremia, sendo isolado de diversos espécimes clínicos. A

bacterina trivalente protegeu contra o desafio heterólogo com este sorovar

5.4 CONCLUSÕES

A vacinação de suínos com bacterina trivalente de *H. parasuis*, sorovares 1, 4 e 5, protegeu suínos contra um desafio contendo quatro mililitros de $1,3 \times 10^9$ UFC/mL dos sorovares 1, 5 e 6, evitando qualquer sinal clínico de doença nos animais desafiados, não induziu reações indesejáveis que pudessem interferir no desempenho dos animais. Na reprodução experimental da doença de Glässer é necessária uma dose de 10^9 UFC de *H. parasuis* por animal.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T., IWASAKI, M., YOSHIKAWA, Y. et al. Na outbreak of Glässer's disease due to *Haemophilus parasuis* in piglets. **Bull. Natl. Inst. Anim. Health**, v.22, n.4, p.182, 1982.
- AMANO, H., SHIBATA, M., KAJIO, N. et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. **Jap. Vet. Med. Sci.**, v.56, n.4, p.639-644, 1994.
- AMANO, H., SHIBATA, M., KAJIO, N. et al Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pig. **Jpn. Vet. Med. Sci.**, v.58, n.6, p.559-561, 1996.
- BARIGAZZI, G., VALENZA, F., BOLLO, E. et al. Anatomohistopathological features related to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13, 1994, **Proceedings...** Bangkok, IPVS. 1994. p.235
- CARTER, G.R. & COLE, J.R. (ed). **Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology**. 5. ed. New York, Academic Press, 1990. 620p.
- CLARK, L.K. Sew: program, problems, performance, potential profits and methods of implementation for various herd sizes. In: GEORGE A YOUNG SWINE CONFERENCE, 1995, Concord. Concord: University of Nebraska, 1995. p.1-14.

- CONNOR J.F. Modified medicated early weaning. In: CONGRESS AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 21, 1990. **Proceedings...** Omaha, AASP, 1990. p.261-265.
- DESROSIERS, R. PHANEUF, J. B., BROES, A. et al. An outbreak of atypical Glässer's disease in Quebec. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 9, 1986, **Proceedings...** Barcelona, IPVS, 1986. p.277.
- 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., 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.
- LITTLE, T.W.A & HARDING, J.D.J. The comparative pathogenicity of two porcine *Haemophilus* species. **Vet. Rec.**, v.88, n.21, p.540-545, 1971.
-

- 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
- MINIATS, O P., SMART, N.L., ROSENDAL, S. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, n.1, p.37-41, 1991.
- 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., KOBAYASHI, K. Glässer's disease in piglets produced by intraperitoneal inoculation with *Haemophilus parasuis*. **Natl. Inst. Anim. Health. Q.**, v.21, n.3, p.121-128, 1981.
- NICOLET, J. *Haemophilus* infectious, In: LEMAN, A.D. (ed). **Disease of swine**. 7. ed. Ames; Iowa State University, 1992. p.526-527.
- NORDSTOGA, K., & FJØLSTAD, M. The generalized Schwartzman reaction and *Haemophilus* infections in pigs. **Path. Vet.**, v.4, n.3, p.245-253, 1967.
- PEET, R.L., FRY, J., LLOYD, J. et al. *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs. **Aust. Vet. J.**, v.60, n.6, p.187, 1983.
- RADOSTITS, O.M., LOUISE RUHNKE, H., LOSOS, G.J. Na outbreak of meningitis in swine caused by *Haemophilus* species of bacterium. **Can. Vet. J.**, v.4, n.10, p.265-270, 1963.
-

- RAPP-GABRIELSON, V.J., KOCUR, G., CLARK, J., et al. Efficacy and duration of immunity of the *Haemophilus parasuis* fractions of suvaxyn® respifend® Mh/Hps, In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996, **Proceedings...**Bologna, IPVS, 1996. p. 300
- RILEY, M.G.I., RUSSELL, E. G., CALLINAN, R. B. *Haemophilus parasuis* infection in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.171, n.7. p.649-651, 1977.
- ROSENDAL, S., BOYD, D.A, GILBRIDE, K.A Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. **Can. J. Comp. Med.**, v.49, n.1, p.68-74, 1985.
- SANTOS et al. 1997 (Frequência de *H.parasuis* no Brasil)
- SANTOS et al. 1997 (Produção e avaliação de uma bacterina homóloga de *H. parasuis*)
- SMART, N.L., MINIATS, O P. Preliminary assessment of *Haemophilus parasuis* bacterin for use in specific pathogen free swine. **Can. J. Vet. Res.**, v.53, n.4, p.390-393, 1989.
- 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., HURNIK, D., MACINNES, J.I. An investigation of enzootic Glässer's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **Can. Vet. J.**, v.34, n.8, p.478-490, 1993.
- SMITH, I.M. & BASKERVILLE, A J. A selective medium for the isolation of *P. multocida* in nasal specimens from pigs. **Br. Vet. J.**, v.139, n.6, p.476-486, 1979.
- SOBESTIANSKY, I., MORES, N., LIEBHOLD, M.M. et al. Doença de Glässer: Uma doença pouco conhecida no Brasil. Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, 1988. 4 p. (EMBRAPA-CNPISA. Comunicado Técnico, 137)
- SOLANO, G., RAPP-GABRIELSON, V., CARVALHO, L. et al. Impact of maternal immunity on subsequent challenge of piglets with *Haemophilus parasuis*. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996, **Proceedings...** Bologna, IPVS, 1996. p.382
- STRAW, B.E. & MEUTEN, D.J. Physical Examination, In: LEMAN, A D. (ed). **Disease of swine**. 7. ed. Ames; Iowa State University, 1992. p.793-807
- TRIGO, E., REESE, L., SIMONSON, R. Efficacy of a *Haemophilus parasuis* commercial bacterin. The serological response in vaccinated pigs. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996, **Proceedings...** Bologna, IPVS, 1996. p.321
- VAHLE, J.L., HAYNES, J.S., ANDREWS, J.J. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.7, n.4, p.476-480. 1995.

CAPITULO 6

DISCUSSÃO GERAL

A suinocultura mundial no final da década de 80 e no começo da década de 90 iniciou uma nova fase, principalmente pelas mudanças no sistema de produção, preconizadas por Harris (1988) e Connor (1990). Os novos sistemas de produção permitiram o controle de diversas doenças que afetavam economicamente a indústria suinícola no mundo. Os Estados Unidos foi o país que mais investiu nestes sistemas de produção, e a suinocultura tradicional dos Estados de Iowa, Minnesota Illinois e Indiana está se transformando rapidamente para competir com os novos sistemas de produção da Carolina do Norte, Kentucky, Oklahoma e outros. Muitos empreendimentos novos estão operando sob a concepção da integração em sistemas de criação em três sítios ou múltiplos sítios. Estes empreendimentos baseiam-se em grandes volumes de produção. Em consequência desta modernização rápida, que exige grande inversão de capital, os pequenos e médios produtores tradicionais viram-se forçados a sair do mercado, com isso reduzindo o número de propriedades de 600.000 em 1980 para 220.000 em 1994 (Bevier, 1995). A suinocultura europeia não acompanhou este ritmo por diversos motivos, inclusive o excesso de produção para o mercado consumidor e a poluição ambiental. No atual contexto de globalização da economia, os países disputam os mercados importadores alicerçados em base tecnológica que se traduz por produtividade.

A suinocultura brasileira tem grandes chances de ocupar uma posição de destaque no mercado de carnes tanto interno como

externo, já que o Brasil possui clima propício e tem grandes extensões territoriais, o que facilita o destino de dejetos, e produz grãos em quantidade e qualidade a preços compatíveis com o mercado internacional. A suinocultura brasileira tem ainda o exemplo de sucesso da avicultura, mas, possui ainda dificuldades a serem superadas. Algumas destas que interferem na produtividade são relacionadas à saúde animal. Na tentativa de se obterem sistemas de produção mais produtivos e competitivos economicamente, as novas construções e as produções já estabelecidas estão adotando os sistemas de criação em três sítios (Harris, 1988) ou de desmama precoce segregada (Connor, 1990). Nem todas as granjas no Brasil, ou no exterior, podem-se adaptar a estes manejos, e para melhorar o desempenho adotam esquemas de vacinação e medicação estratégica contra as principais doenças respiratórias de suínos (pneumonia enzoótica, pleuropneumonia suína e rinite atrófica), melhorando visivelmente a produtividade. O controle obtido por sistemas de manejo ou vacinações mais medicação permitiu a visualização de algumas doenças até então consideradas de pouca ou nenhuma importância econômica na suinocultura. Uma destas é a doença de Glässer, causada pelo *Haemophilus parasuis*, que se caracteriza por afetar rebanhos de alto padrão sanitário (Nielsen & Danielsen, 1975; Nielsen, 1980; Madsen, 1984; Miniats et al., 1986; Smart et al., 1993; Budde & Olson, 1995).

H. parasuis é um agente difícil de ser isolado e manipulado em laboratório (Nicolet, 1992), por isto há relativamente pouca informação sobre ele. Não existe estudo sobre a epidemiologia da infecção por *H. parasuis* em qualquer tipo de granja e, principalmente, nas de exploração de manejo tradicional. Paralelo a este fato o *H. parasuis* foi classificado em 15 sorovarietades diferentes por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992), que também estudaram a patogenicidade dos sorovares, tendo sido verificado que os sorovares 1, 5, 10, 12, 13 e 14 eram os mais virulentos e os 2, 4 e 15, eram de média virulência. O sorovar 8 foi classificado

como de baixa virulência e os sorovares 3, 6, 7, 9 e 11, como não-virulentos.

Na suinocultura do Brasil e da América Latina pouco se conhece sobre o *H. parasuis*, sobre a epidemiologia da doença de Glässer em granjas de manejo tradicional e sobre a prevalência ou frequência dos diversos sorovares. A literatura internacional relata o uso de vacinas autógenas para controle de surtos em rebanhos de alto padrão sanitário (Nielsen & Danielsen, 1975; Riising, 1981; Smart et al., 1993; Budde & Olson, 1995). Contudo, as vacinas propostas para comercialização nos EUA ainda estão sendo avaliadas (Rapp-Gabrielson et al., 1996; Trigo et al., 1996) e não foram liberadas para o mercado. No Brasil não há qualquer tipo de estratégia para controlar surtos da doença de Glässer e não se conhece o uso de vacinas.

Neste trabalho foram estudados aspectos epidemiológicos do *H. parasuis* na suinocultura brasileira, principalmente nos estados da região sudeste, tendo-se constatado a presença deste agente em 204 propriedades, tanto em animais doentes como naqueles aparentemente sadios. Os resultados mostraram que os meses de julho, agosto e setembro são aqueles em que ocorre maior frequência de manifestações de infecções por *H. parasuis*, provavelmente pela baixa temperatura, grande amplitude térmica diária e presença de ventos. Nesta situação, os leitões saem da zona de conforto e se estressam pelas temperaturas baixas. Estes fatores climáticos, aliados a práticas de manejo inadequadas, tornam esta época do ano mais propícia à ocorrência da doença. A faixa etária mais atingida é a de 70 a 100 dias de idade, que coincide com a mudança de ambiente da creche para os barracões de recria. O pulmão, a traquéia e o focinho são os espécimes clínicos de eleição para exames laboratoriais visando ao isolamento do *H. parasuis*. Estas informações são de importância para o controle da doença ao nível de campo.

Estudou-se ainda a presença dos sorovares de *H. parasuis* na suinocultura do Brasil, tendo-se observado, pela primeira vez no Brasil e na América Latina, a presença de todos os 15 sorovares. Relatos anteriores sobre a presença dos 15 sorovares foram conduzidos por Kielstein & Rapp-Gabrielson (1992) na Alemanha, que examinaram 290 amostras originadas em 20 propriedades e observaram a predominância dos sorovares 4 e 5. Os sorovares mais freqüentes no Brasil foram, por ordem de ocorrência, os de número 1, 4, 12 e 5, representando 47,35% do total de 321 amostras examinadas de 204 propriedades de exploração de manejo tradicional da suinocultura. Destes, somente o sorovar 4 é considerado de média virulência (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992), os demais são de alta virulência para suínos, sugerindo a ocorrência de quadros graves da doença de Glässer na suinocultura tradicional do Brasil. Entretanto, não se observa na literatura brasileira a descrição de surtos da doença de Glässer em qualquer tipo de granja, a não ser o relato de Sobestiansky et al. (1988) em uma pequena propriedade de 15 matrizes no sul do Brasil. Em 28,92% (59) das 204 propriedades estudadas neste trabalho foram observados mais de um sorovar, sendo os mais freqüentes, os sorovares 1, 4, 9 e 12. Estes resultados alertam para o cuidado e as possibilidades de falha quando se implementar um programa de controle do *H. parasuis* em uma propriedade.

Foi produzida e avaliada uma bacterina monovalente de *H. parasuis*, sorovar 5 (Nagazaki). Este sorovar é considerado o mais patogênico de todos os 15 conhecidos. É tido como o principal responsável pelos quadros da doença de Glässer. A avaliação da bacterina foi feita em 64 leitões de 21 dias de idade, divididos em dois grupos, A e B, de 32 leitões cada. O grupo A foi vacinado e o grupo B permaneceu como controle não-vacinado. Aos 65 dias de idade ambos os grupos foram desafiados com o mesmo sorovar 5 de *H. parasuis* utilizado na confecção da vacina. O título do desafio foi de 10^9 UFC/mL, sendo utilizado quatro mililitros pela via intratraqueal. Nos animais do grupo B 31 morreram após

apresentação de um quadro clínico, e à necropsia observaram-se lesões típicas da doença de Glässer. Os animais do grupo A resistiram ao desafio, permanecendo saudáveis durante todo o período após o desafio e à necropsia não apresentaram qualquer lesão macroscópica. A análise pelo qui-quadrado com um grau de liberdade, $p < 99,99$, foi de 56,30, corrigido por Yates, indicando uma associação altamente significativa da variável vacina com a proteção dos leitões desafiados. É importante chamar a atenção para a dose de desafio usada e para o fato de os leitões vacinados resistirem sem apresentarem sinais clínicos. Rapp-Gabrielson et al. (1996) e Trigo et al. (1996), ao avaliarem vacinas contra *H. parasuis*, utilizaram dose-desafio com títulos inferiores.

A necessidade de proteção contra mais de um sorovar de *H. parasuis* é de grande importância para a suinocultura brasileira, pois os sorovares 1, 4, 5 e 12 foram os mais frequentemente isolados (47,4%) na população suína avaliada neste trabalho. Em 59 (28,92%) das 204 propriedades estudadas foi detectada a presença de mais de um sorovar, sendo que em algumas propriedades havia, simultaneamente, seis ou sete. Rapp-Gabrielson et al. (1996) avaliaram uma bacterina mista de *Mycoplasma hyopneumoniae* e *H. parasuis*, sorovares 4 e 5, os mais prevalentes nos Estados Unidos, e observaram proteção contra os sorovares 4, 5, 12 e 13, mas nenhum resultado contra os sorovares 2 e 14. No Brasil não existe vacina contra o *H. parasuis*, o que torna o controle da doença de Glässer pouco eficiente. Uma bacterina contendo os sorovares 1, 4 e 5 cobrirá 36% da população suína frente a um desafio homólogo, e caso haja proteção heteróloga, o que já foi relatado por Rapp-Gabrielson et al. (1996), este percentual poderá aumentar. O sorovar 6 é considerado avirulento (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992), mas é possível que após seguidas exposições naturais ele seja capaz de reproduzir o quadro da doença de Glässer.

Além da bacterina monovalente, produziu-se e avaliou uma bacterina trivalente de *H. parasuis* com os sorovares 1, 4 e 5. Esta bacterina não induziu reações indesejáveis que pudessem interferir no desempenho dos animais. Cinquenta e um leitões de 21 dias de idade foram divididos em três grupos (C, D, E) de 17 animais. Quatorze foram vacinados em cada grupo, permanecendo três como controle. Aos 73 dias de idade cada grupo foi desafiado por via intratraqueal, com quatro mililitros de 10^9 UFC/mL dos sorovares 1, 5 e 6, respectivamente. Todos os três animais de cada grupo morreram até dois dias após o desafio, com lesões típicas da doença de Glässer. Os animais vacinados de todos os grupos resistiram aos desafios e permaneceram clinicamente sadios durante todo o período de observação e na necropsia não apresentaram qualquer lesão macroscópica. O sorovar 6, que é considerado avirulento (Kielstein & Rapp-Gabrielson, 1992), após passagens em suínos, foi capaz de reproduzir o quadro típico da doença de Glässer. Esse dado salienta a necessidade de se utilizar, em procedimentos de desafio, amostra virulenta capaz de reproduzir o quadro da doença e não amostra mantida em laboratório por anos em várias passagens em meios artificiais. Esse dado também chama a atenção para o potencial patogênico desta amostra e mostra a possibilidade de sua participação no desencadeamento da doença em rebanhos portadores. A vacina trivalente induziu proteção homóloga contra os sorovares 1 e 5 e proteção heteróloga contra o sorovar 6, sugerindo que poderá ser utilizada na suinocultura brasileira principalmente nas propriedades com mais de um sorovar.

SUMMARY

In the present study the epidemiological aspects of the infection by *Haemophilus parasuis* isolated from swine with or without clinical symptoms from 204 herds with more than 50 sows using the traditional management in the States of Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Goiás, Mato Grosso and Bahia, were considered. The highest frequency of infection by *H. parasuis* was observed between July and September. Animals from 70 to 100 days old were more affected. Samples from lung, trachea and nose were used for laboratory analysis. The frequency of *H. parasuis* serovars were studied in the 321 samples isolated from the 204 herds. It was observed, for the first time in Brazil and South America, the presence of all the 15 serovars, however the most frequent were 1, 4, 5 and 12 which represented 47,4% of all analyzed samples. In 59 (28,9%) of the herds there were more than one serovars with predominance of 1, 4, 9 and 12. A monovalent bacterin of *H. parasuis* serovar 5 was produced and tested against 65 days old animals. This bacterin protect all 32 pigs challenged against 4 ml of homologous bacteria containing 2.5×10^9 UFC/mL, however 31 of the 32 non-vaccinated pigs died. A trivalent bacterin containing 1, 4 e 5 serovars of *H. parasuis* was also produced and evaluated against 3 groups (C, D and E) of 17 piglets in each one. Fourteen piglets were vaccinated and the other 3 were left without vaccination as controls. The 73 days old animals of each group were challenged with intratracheal 4 mL of 10^9 UFC/mL of the 1, 5 or 6 serovars, respectively. All the 14 vaccinated animals of each group survived to the challenge but all 3 non-vaccinated animals of each

group died two days after the challenge showing typical injuries of Glässer disease.

Key-words: Swine, *Haemophilus parasuis*, serovars, monovalent bacterin, trivalent bacterin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEVIER, G.W. Modern Management practices, In: SEMINAR SEVENTH PIC INTERNATIONAL SEMINAR, 7, 1995. **Proceedings...** Des Moines, PIC, 1995. P.1-9
- BUDDE, R., OLSON, L. Glässer'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
- 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., 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.
-

- 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
- NICOLET, J. *Haemophilus* infectious, In: LEMAN, A D. (ed). **Disease of Swine**. 7. ed. Ames; Iowa State University, 1992. p.526-527.
- 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, 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.
- RAPP-GABRIELSON, V.J., KOCUR, G., CLARK, J. et al. Efficacy and duration of immunity of the *Haemophilus parasuis* fractions of suvaxyn® respifend® Mh/Hps, In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996, **Proceedings...** Bologna, IPVS, 1996. p.300.
- RIISING, H.J. Prevention of Glässer's disease through immunity to *Haemophilus parasuis*. **Zentralb. Vet. Med. B.**, v.28, n.2, p.630-638, 1981.
- SMART, N.L., HURNIK, D., MACINNES, J.I. An investigation of enzootic Glässer's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. **Can. Vet. J.**, v.34, n.8, p.478-490, 1993.

SOBESTIANSKY, I., MORES, N., LIEBHOLD, M.M. et al.
Doença de Glässer: Uma doença pouco conhecida no Brasil.
Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1988. 4p. (EMBRAPA-
CNPSA. Comunicado Técnico, 137)

TRIGO, E., REESE, L., SIMONSON, R. Efficacy of a
Haemophilus parasuis commercial bacterin. The serological
response in vaccinated pigs. In: CONGRESS
INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 14, 1996,
Proceedings... Bologna, IPVS, 1996. P. 321