

*Aos meus pais e
Ao Arnaldo, por tudo.*

Agradecimentos

Ao professor e orientador Roberto Guedes pelos ensinamentos e pela confiança.

À professora Simone Oliveira por todo seu apoio, atenção e pelas valiosas sugestões durante todo o projeto.

Ao professor Andrey Pereira Lage pela sua colaboração em todo o projeto, por disponibilizar os equipamentos de seu laboratório e o programa Bionumerics, e por ter aceitado fazer parte da banca examinadora.

Ao professor José Lúcio dos Santos pelo fornecimento das amostras e por ter aceitado fazer parte da banca examinadora.

Ao professor Marcos Bryan pela atenção e pelas sugestões.

Aos professores do setor de Patologia: Profa. Rogéria Serakides, Profa. Roselene Ecco, Prof. Ernane Fagundes e Prof. Renato de Lima, pelos ensinamentos fundamentais e cooperação.

À Marina Rios pela ajuda valiosa na execução do projeto.

Aos colegas do setor de Patologia: Sílvia França, Aline, Cristiane, Fábio, Jankerle, Natália, Tatiane, Fabiana, Sílvia, Aliny, Eduardo, Cíntia, Renatinha, Mariana, Juneo, Teane e Raquel pela disposição em ajudar, pela amizade e por todos os momentos compartilhados.

À Mel e à Marilene por ajudarem sempre com boa vontade e pela convivência agradável.

Aos amigos da Moradia Universitária da UFMG, pela amizade sincera durante todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1. Etiologia	11
3.2. Sorotipos	11
3.3. Fatores de Virulência	12
3.4. Patogenia	13
3.5. Sinais Clínicos e Lesões	14
3.6. Métodos de Diagnóstico	14
3.7. Tratamento	15
3.8. Controle, Prevenção e Imunidade	16
3.9. Epidemiologia	17
3.10. Epidemiologia Molecular	18
3.10.1. Restriction endonuclease fingerprinting (REF)	19
3.10.2. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)	19
3.10.3. Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).	19
3.10.4. Multilocus sequence typing (MLST)	19
3.10.5. ERIC-PCR	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Origem do material	21
4.2. Cultivo bacteriano	21
4.3. Extração do DNA	21
4.4. ERIC-PCR	21
4.5. Análise dos perfis obtidos	22
4.6. Índice de diversidade	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Diferenciação de amostras	22
5.2. Diversidade genética dentro de grupos de sorotipos	25
5.3. Diversidade genética dentro e entre rebanhos	28
5.4. Diversidade genética em relação ao local de isolamento	31
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras de <i>Haemophilus parasuis</i> , sorotipo, rebanho e estado de origem, ano de isolamento, material clínico de onde cada amostra foi isolada e genótipo.....	23
Tabela 2	Distribuição de sorotipos por local de isolamento entre 44 isolados de <i>H. parasuis</i> obtidos de 14 rebanhos.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dendrograma, calculado pelo método UPGMA, do controle positivo Nagasaki, adicionado às reações de ERIC-PCR realizadas neste estudo.....	23
Figura 2	Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, apresentando as amostras não sorotipáveis (NT).....	26
Figura 3	Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, apresentando os sorotipos 2, 4 e 5.....	27
Figura 4	Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, apresentando as 45 amostras de <i>H. parasuis</i> identificadas.....	30
Figura 5	Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, representando os rebanhos M e N.....	32

RESUMO

Quarenta e cinco isolados de *H. parasuis*, trinta e um desses previamente sorotipados, provenientes de 14 rebanhos suínos brasileiros foram genotipados pela técnica de ERIC-PCR. Os perfis genômicos foram analisados e dendrogramas foram construídos para comparar amostras de mesmo sorotipo, rebanho de origem ou local de isolamento e para avaliar a variabilidade genética dentro dessas categorias. Vinte e dois genótipos distintos (I – XXII) foram identificados com um índice de diversidade de $D=0,93$. Amostras não sorotipáveis (NT) foram as mais prevalentes (56,25%) e apresentaram alta diversidade genética, com treze genótipos distintos. Amostras NT também apresentaram alta variabilidade genética dentro de rebanhos, sendo observados dois (rebanho M) e seis (rebanho F) isolados NT diferentes, provenientes de um mesmo rebanho. O rebanho F, com 11 isolados avaliados, teve os perfis genéticos mais diversos, com oito amostras diferentes. Cinquenta e sete por cento dos rebanhos foram afetados por dois ou mais genótipos. A diversidade genética entre as amostras estudadas foi ampla, independente do local de isolamento, já que isolados do trato respiratório apresentaram 21 dos 22 genótipos detectados, e as seis amostras isoladas de locais sistêmicos apresentaram quatro genótipos distintos. As amostras de genótipo II foram isoladas somente do trato respiratório superior. O fato de terem sido isoladas do trato respiratório superior indica que podem ser de baixa virulência. Em locais fora do sistema respiratório, tais como pericárdio, pleura e cérebro, foram isolados os sorotipos 5 e NT. Os perfis de ERIC-PCR para isolados de *H. parasuis* foram altamente heterogêneos, mas os genótipos foram úteis para definir a variabilidade de amostras dentro e entre rebanhos.

Palavras-chaves: suíno, *Haemophilus parasuis*, genotipagem, ERIC-PCR

ABSTRACT

Forty-five H. parasuis isolates, thirty-one previously serotyped, recovered from 14 Brazilian swine herds, were genotyped by ERIC-PCR. Genomic fingerprints were analyzed and clusters were constructed to compare isolates from the same serotype, herd or site of isolation, and to value the genetic variability within categories. Twenty-two distinct genotypes (I – XXII) were identified with a diversity index of $D=0,93$. Non-typable strains (NT) were the most prevalent (56,25%) and had high genetic diversity, with thirteen distinct genotypes. NT strains also had high genetic variability within herds, with two (herd M) and six (herd F) different strains from a single herd. Herd F, from which 11 isolates were evaluated, had the most diverse genotypes, with eight different strains. Fifty percent of the herds were affected by two or more genotypes. The genetic diversity among studied isolates was considerable, despite of isolation sites. Isolates from respiratory tract had 21 from 22 detected genotypes, and six isolated strains from systemic sites had four distinct genotypes. Genotype-II isolates were obtained from upper respiratory tract only, which suggested that these strains might be classified as non-virulent. Isolates obtained from systemic sites, such pericardium, pleura and brain, were serovar 5 or NT. ERIC-PCR patterns for H. parasuis isolates were highly heterogeneous, but fingerprints were useful to define strain variability within and among herds.

Key words: swine, *Haemophilus parasuis*, genotyping, ERIC-PCR

1. Introdução

O controle de doenças infecciosas, como a doença de Glässer, é uma preocupação em todo o mundo devido aos prejuízos econômicos acarretados ao sistema de produção. No Brasil, existe variação significativa da frequência de isolamento de *Haemophilus parasuis* em diferentes regiões do país, variando de 0,3%, na Bahia e Mato Grosso, a 65,7% em Minas Gerais. Isto em uma população suína industrial estimada em 31,8 milhões de cabeças em 2007 (Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/>). Infelizmente, ainda não há dados disponíveis no Brasil sobre o impacto econômico de infecções causadas por *H. parasuis*.

H. parasuis é atualmente reconhecido como um dos principais patógenos bacterianos envolvidos em alta mortalidade de suínos em fase de recria. As lesões características da infecção sistêmica por *H. parasuis* incluem meningite, pleurite, pericardite, peritonite e artrite fibrinopurulenta. Mortalidade em populações não imunes pode variar de 10 a 50%, dependendo da virulência da amostra envolvida. Animais que sobrevivem à infecção aguda geralmente desenvolvem aderências fibrosas nas cavidades torácica e abdominal, sendo condenados ao abate. O quadro epidemiológico é extremamente variável entre granjas com diferentes manejos. Os custos relacionados à alta mortalidade, tratamentos com antibióticos e condenação de carcaças são economicamente importantes para muitos rebanhos, e a prevenção e controle da infecção por *H. parasuis* tornam-se prioridades.

O conhecimento da epidemiologia de *H. parasuis* dentro e entre rebanhos suínos é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle deste microrganismo. Recentemente, técnicas moleculares como o Rep-PCR ou *Repetitive Element based*

Polymerase Chain Reaction, têm sido utilizadas para o estudo da epidemiologia molecular de diversos patógenos bacterianos. O estudo da epidemiologia molecular da infecção por *H. parasuis* permite a caracterização da variabilidade genética de amostras envolvidas em mortalidade, definição de grupos de amostras prevalentes, e a identificação de fontes de amostras virulentas. Estas informações são cruciais para seleção de isolados para a produção de vacinas autógenas e para a prevenção de introdução de animais carreadores de amostras virulentas em rebanhos susceptíveis. Além disso, a genotipagem de *H. parasuis* permite o constante monitoramento de amostras envolvidas em novos casos clínicos, e a atualização das amostras vacinais, quando necessário. Todas as medidas são importantes para prevenção e controle da infecção por *H. parasuis*.

Atualmente, esta técnica de diagnóstico não está disponível em nenhum laboratório mineiro ou brasileiro. Minas Gerais é um estado líder no diagnóstico de enfermidades de suínos, possuindo três dos laboratórios veterinários mais utilizados do país.

Desta forma, este trabalho tem como objetivos:

- (1) Associar genótipos e sorotipos com intuito de observar a variação genética dentro de cada sorotipo e verificar a variação genética de amostras de *H. parasuis* não sorotipáveis;
- (2) Verificar a variação genética de amostras dentro de uma mesma granja, entre diferentes granjas e entre diferentes sítios de isolamento.

2. Revisão de Literatura

2.1. Etiologia

Haemophilus parasuis, uma espécie estabelecida por Biberstain e White em 1969, é parte da microbiota normal do trato respiratório de suínos, sendo normalmente isolada da cavidade nasal, tonsila e traquéia de animais saudáveis (Oliveira e Pijoan, 2004a).

Outrora considerada uma doença esporádica de suínos jovens submetidos a estresse, a polisserosite e artrite suína (doença de Glässer), causada pelo *H. parasuis*, tem emergido como uma importante doença bacteriana afetando suínos em todo o mundo (Rapp-Gabrielson et al., 2006). Atualmente é considerada uma das doenças mais importantes economicamente na indústria de suínos, devido aos altos custos com tratamentos antibióticos e descarte de animais (Nedbalcova et al., 2006).

A associação de um pequeno bastonete Gram-negativo com serosite e poliartrite fibrinosas em suínos foi descrita pela primeira vez por Glässer em 1910 (Rapp-Gabrielson et al., 2006). A necessidade de certos cofatores para crescimento constitui o principal critério para a inclusão de uma bactéria Gram-negativa no gênero *Haemophilus*. A natureza desses requerimentos determina a denominação de organismos para espécies dentro de gêneros. *Haemophilus parasuis*, que era conhecido como *Haemophilus suis*, foi originalmente descrito requerendo dois cofatores para crescimento: fator X, fornecido pela hemina ou determinadas porfirinas, e fator V, fornecido como 'Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo' (NAD). Foi demonstrado que o organismo causador da Doença de Glässer não requeria o fator X (porfirina de ferro) para crescimento, sendo, portanto, um grupo de bactérias diferente de *H. suis*. Então, segundo as normas de nomenclatura das espécies de *Haemophilus*, que recomendam

usar o prefixo “para-” em organismos que não requerem o fator X, esse novo grupo foi denominado *Haemophilus parasuis*, e incluído na família *Pasteurellaceae* (Biberstain e White, 1969).

Morozumi e Nicolet (1986a) demonstraram a presença de material capsular em cepas de *H. parasuis*, através de extração pelo calor e separação por eletroforese, com subsequente precipitação com Cetavlon (hexadecyl trimethylammonium). Estes autores sugerem que o material capsular pode ser um polissacarídeo ácido ou outra estrutura polissacarídica. Os isolados não encapsulados tenderam a ser polimórficos, variando de bastonetes a filamentos, ao contrário da forma cocobacilar das amostras encapsuladas. Em adição à cápsula, *H. parasuis* também produz estruturas filamentosas, semelhantes a fímbrias, quando cultivadas em membrana cório-alantóidea de ovos embrionados de galinha (Munch et al., 1992).

Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) ou fator V, necessário para crescimento, pode ser fornecido em meio de cultivo constituído por sangue aquecido (Agar chocolate) ou por crescimento em Agar sangue nas proximidades de uma estria de uma cepa de *Staphylococcus sp.* (satelitismo). Após 24-48 horas de crescimento, observam-se colônias pequenas, translúcidas e não hemolíticas em agar sangue (Rapp-Gabrielson et al., 2006).

2.2. Sorotipos

Sorotipagem pode ser realizada por difusão em gel de agar (Morozumi e Nicolet, 1986b; Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992; Santos, 1997) ou hemaglutinação indireta (Del Rio et al., 2003; Tadjine et al., 2004). Em ambos os casos, antígenos termoestáveis são caracterizados utilizando-se soro policlonal específico para cada sorotipo. A ocorrência de isolados de *H. parasuis* não-sorotipáveis tem sido comum, variando de 15,2% (Rapp-

Gabrielson e Gabrielson, 1992) a 41% (Rafiee e Blackall, 2000).

Atualmente, são conhecidos 15 sorotipos (1-15) de *H. parasuis* através do teste de imunodifusão (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992). Na Alemanha os sorotipos 4 e 5 foram os mais prevalentes (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992). Os sorotipo 4 (39%) e isolados não sorotipáveis (27%) foram os mais prevalentes nos rebanhos norte americanos (Oliveira et al., 2003). Normalmente, é possível isolar mais de um sorotipo do mesmo rebanho e, até de um mesmo animal (Smart et al., 1988). No Brasil, os 15 sorotipos já foram identificados e, entre 321 amostras de *H. parasuis* isolados de suínos oriundos de 204 propriedades, os sorotipos mais prevalentes foram 1, 4, 5 e 12 (representando 47% dos isolados) e 8,7% das amostras foram não sorotipáveis (Santos, 1997).

2.3. Fatores de Virulência

Existem diferenças de virulência entre os sorotipos de *H. parasuis*, o que influencia na capacidade de causar a doença. Investigações sorológicas, fenotípicas e genotípicas entre isolados de *H. parasuis* demonstraram considerável heterogeneidade que pode estar associada à virulência. Mas os fatores de virulência de *H. parasuis* ainda não estão bem definidos. A classificação deste microrganismo em um sorotipo específico é, em geral, considerada como um indicador de virulência. Infecção intraperitoneal com os sorotipos 1, 5, 10, 12, 13 e 14 causou alta morbidade e mortalidade em suínos SPF (livre de patógenos específicos), sendo por isso considerados altamente patogênicos. Os sorotipos 2, 4, 8 e 15 causaram polisserosite sem mortalidade e foram designados com moderadamente patogênicos e os sorotipos 3, 6, 7, 9 e 11 não provocaram nenhum sinal clínico, sendo considerados não patogênicos ou de baixa patogenicidade (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992).

A presença de cápsula está geralmente associada à virulência dentro do gênero *Haemophilus*. Morozumi e Nicolet (1986a) demonstraram a presença de cápsula em 12 de 32 amostras de *H. parasuis* estudadas. Entretanto, entre as amostras analisadas, cápsula foi encontrada, principalmente, em isolados da cavidade nasal de suínos aparentemente saudáveis (7 de 10 amostras), e, menos frequentemente (3 de 11 amostras), relacionadas com isolados de animais apresentando doença clínica.

Isolados de campo de *H. parasuis* podem ser divididos em dois grupos com base nos perfis de proteínas totais obtidos após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). A grande maioria dos isolados caracterizados como PAGE tipo I são avirulentos ou de baixa virulência, enquanto isolados classificados como PAGE tipo II possuem uma proteína específica de membrana (37 kDa) comum em isolados de moderada a alta virulência (Morozumi e Nicolet, 1986ab; Morikoshi et al., 1990; Oliveira e Pijoan, 2004b). Esses resultados foram confirmados por análise computadorizada dos perfis de proteínas totais de isolados de *H. parasuis* por Oliveira e Pijoan (2004a).

Estudos recentes têm demonstrado que virulência pode diferir entre amostras isoladas de diferentes locais do organismo e também pode estar relacionada à presença de certas proteínas externas de membrana (OMP). No estudo de Ruiz et al. (2001) foi observado que o perfil de OMP de isolados sistêmicos (não respiratórios) foi homogêneo, sendo sugerido a existência de relação clonal entre amostras virulentas e que a expressão de certos perfis de OMP podem estar relacionados à virulência.

Lipooligosacarídeos (LOS) são endotoxinas componentes da membrana externa de bactérias do gênero *Haemophilus* (Inzana e Corbeil, 2004), e são liberados com a lise bacteriana, causando várias formas de

resposta no hospedeiro, incluindo deposição de fibrina em capilares e coagulação intravascular. Lesões vasculares extensivas têm sido observadas em suínos infectados, especialmente nos casos em que não há polisserosite (Peet et al., 1983). Entretanto, Zucker et al. (1996) não detectou diferença significativa na produção de LOS entre amostras virulentas e avirulentas de *H. parasuis*. Já Amano et al. (1997) associaram a presença de anticorpos contra LOS no sangue circulante de animais inoculados com o isolamento de *H. parasuis* sorotipo 5.

Neuraminidase (sialidase) é um provável fator de virulência dos membros da família *Pasteurellaceae*. Lichtensteiger e Vimr (1997) demonstraram a produção de neuraminidase em 90% dos isolados de campo de *H. parasuis*. Recentemente, Lichtensteiger e Vimr (2003) relataram a detecção e purificação de neuraminidase em *H. parasuis*. A função da neuraminidase na virulência de *H. parasuis* ainda precisa ser determinada. Entretanto, neuraminidase, que é frequentemente encontrada em patógenos que acometem animais tais como *Pasteurella multocida* e *E. coli*, pode agir interferindo com os sistemas de defesa do hospedeiro ao remover resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro. Esta função poderia expor receptores necessários para a colonização ou invasão de células do hospedeiro (Lichtensteiger e Vimr, 1997). Por esta razão, a presença ou ausência de atividade de neuraminidase em um isolado poderia ser utilizada como um critério adicional para a diferenciação de amostras de *H. parasuis* na preparação de uma vacina autógena (Lin, 2005).

Fazem-se necessários muitos estudos para se comprovar a associação entre a expressão dos fatores citados anteriormente e virulência em infecções por *H. parasuis*. O desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais específicas, tais como a detecção de genes específicos para

virulência, permitirá a identificação precisa de amostras virulentas.

2.4. Patogenia

A infecção por *H. parasuis* ocorre através de aerossóis, mas pouco se conhece sobre a patogenia, já que o agente pode ser isolado do aparelho respiratório de animais sadios (Vahle et al., 1995). O *H. parasuis* possui tropismo particular para as membranas serosas, sinovial e meningeal e para o parênquima pulmonar (Amano et al., 1994; Vahle et al., 1995; Segales et al., 1997; Kirkwood et al., 2001).

Fatores envolvidos na invasão sistêmica de *H. parasuis* durante a infecção não foram ainda bem estudados. Vahle et al. (1997) demonstraram que o isolamento de *H. parasuis* da região mediana da cavidade nasal acontecia quando havia concomitantemente uma rinite aguda supurada e perda de células mucociliares. Os autores também sugeriram que estas alterações na mucosa poderiam facilitar a invasão de *H. parasuis* e seu acesso à circulação sanguínea. Entretanto, não foi possível detectar *H. parasuis* nos locais de perda ciliar e degeneração de células mucosas, nem por microscopia eletrônica nem por imunistoquímica.

O desencadeamento do quadro clínico e as lesões parecem estar relacionados com uma resposta inflamatória severa induzida pela infecção com o *H. parasuis*. Vários fatores estressantes podem precipitar a doença num rebanho. Além disso, o estado de imunidade do animal influi diretamente no desenvolvimento da doença. Animais sem imunidade, ao serem introduzidos em rebanhos infectados, tendem a desenvolver doença severa, podendo morrer em menos de três dias. A passagem seriada de uma amostra avirulenta em suínos pode recuperar sua capacidade de induzir a doença (Santos e Sobestiansky, 2007).

2.5. Sinais Clínicos e lesões

A forma de apresentação dos sinais clínicos é muito variada e inespecífica em infecções por *H. parasuis*, incluindo doença de Glässer (polisserosite e meningite fibrinosas em suínos jovens), artrite com pneumonia em suínos adultos, pneumonia secundária (Quinn et al., 1999), septicemia (sem polisserosite) (Peet et al., 1983) e miosite aguda (músculo masseter) (Hoefling, 1991). O curso da doença pode ser superagudo ou agudo em animais totalmente susceptíveis frente a amostras de elevada patogenicidade. Os primeiros sintomas, geralmente, são aumento da temperatura corpórea, apatia e inapetência. Depois pode-se observar tosse, dispnéia, perda de peso, laminite, incordenação, cianose, decúbito e morte (Rapp-Gabrielson et al., 2006; Santos e Sobestiansky, 2007). *H. parasuis* pode causar infecção sistêmica ocasionalmente, a qual pode resultar em morte súbita ou no desenvolvimento de lesões como meningite, pericardite, pleurite, peritonite e artrite fibrinopurulentas. Os leitões afetados podem morrer, ou a doença pode evoluir para a forma crônica, com presença de artrite crônica e aderências de serosas (Amano et al., 1994; Rapp-Gabrielson et al., 1999; Oliveira e Pijoan, 2004a; Santos e Sobestiansky, 2007).

Microscopicamente, há inflamação fibrinopurulenta com infiltração de neutrófilos e alguns mononucleares nas serosas afetadas (Santos e Sobestiansky, 2007), e, na forma septicêmica, geralmente podem ser encontrados trombos nos glomérulos renais, sinusóides hepáticos e capilares pulmonares, necrose hepática e nos linfonodos, edema no pulmão e meningite fibrinopurulenta (Peet, et al., 1983; Amano et al., 1994).

2.6. Métodos de diagnóstico

A suspeita da doença no campo é freqüente, mas a confirmação laboratorial é rara, devido às dificuldades de isolamento de *H. parasuis*, principalmente em função de medicações a campo, que inibem o crescimento do agente *in vitro*, e pela contaminação por microrganismos menos exigentes (Santos e Sobestiansky, 2007).

A importância do diagnóstico baseado apenas nos sinais clínicos e lesões é pequena devido à baixa especificidade. É, portanto, necessário associar essas informações ao histórico dos animais acometidos e a métodos diagnósticos mais adequados. Os sinais clínicos e as lesões devem ser diferenciados dos causados por *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Mycoplasma* sp. (Rapp-Gabrielson et al., 1997; Santos e Sobestiansky, 2007).

O isolamento de *H. parasuis* de amostras clínicas deve ser realizado a partir de suínos que apresentem sinais clínicos característicos da infecção e não tenham recebido tratamento com antibióticos por pelo menos uma semana. Os animais devem ser sacrificados, pois animais já mortos têm menos chance de isolamento de *H. parasuis*. Culturas puras de *H. parasuis* podem ser obtidas a partir de exsudato do pericárdio, pleura, peritônio, articulações e líquido cérebro-espinhal, podendo também utilizar sangue presente no coração. O meio de cultura mais utilizado é o agar com sangue desfibrinado de equino e estria de *Staphylococcus* sp., sendo que o fenômeno de satelitismo é um bom indicador da presença do agente. As colônias de *H. parasuis* são vistas após 48 horas de incubação a 37°C (Santos e Sobestiansky, 2007).

Para realizar a detecção de anticorpos contra *H. parasuis*, os testes de fixação do complemento (FC) (Nielsen, 1993; Takahashi et al., 2001), hemaglutinação indireta (HI) (Miniats et al., 1991a) e ELISA

(Miniats et al., 1991a, Solano-Aguilar et al., 1999) podem ser utilizados. Anticorpos circulantes têm sido demonstrados em casos clínicos com curso agudo da doença por aproximadamente uma semana, mas foram detectadas reações cruzadas consideráveis (Nielsen, 1993). Entretanto, o teste de ELISA com células totais inativadas por formalina pode ser usado para a investigação de títulos de anticorpos em porcas e a resposta imune de leitões após vacinação (Solano-Aguilar et al., 1999).

O teste de imunoistoquímica (IHQ) também pode ser utilizado para diagnóstico *H. parasuis*. IHQ combina técnicas morfológicas, imunológicas e bioquímicas, permitindo a detecção de organismos fixados no citoplasma de fagócitos (Amano et al., 1994; Segales et al., 1997; Oliveira, 1998). Além de ser útil no diagnóstico de agentes infecciosos, a IHQ permite ainda a avaliação da relação entre a presença de lesões e do antígeno, geralmente com vantagens quanto à rapidez, ao custo e a durabilidade do material corado (Oliveira, 1998). O pulmão e o baço são os mais recomendados para o diagnóstico de infecção pelo sorotipo 5 de *H. parasuis* pelo método da estreptavidina-biotina marcada, principalmente quando apresentam lesões. Entretanto, alguns anticorpos policlonais usados para diagnóstico de *H. parasuis* pelo método de IHQ apresentaram reação cruzada entre os sorotipos 5 e 6 com *A. pleuropneumoniae* (Segales et al., 1997; Oliveira, 1998).

Devido às dificuldades de cultivo de *H. parasuis*, o desenvolvimento de um PCR específico levou a uma melhoria na detecção desta bactéria. O teste de PCR permite uma identificação específica (10^2 CFU/ml) de *H. parasuis* diretamente de amostras clínicas, e, além do mais, pode detectar organismos sem vida (Oliveira et al., 2001). Entretanto, uma fraca reação positiva com *A. indolicus* foi obtida neste teste de PCR. Dessa forma, é recomendado o uso deste teste para exame

de isolados recolhidos somente de locais sistêmicos (fora do trato respiratório), já que *A. indolicus* é habitante comum do trato respiratório superior (Oliveira e Pijoan, 2004b).

Hibridização *in situ* (HIS) para detectar seqüências gênicas de *H. parasuis* foi desenvolvida por Jung e Chae (2004). HIS permite a associação direta de *H. parasuis* com tecidos lesionados e tem vantagem em relação à IHQ porque não necessita da disponibilidade de anticorpos específicos. A associação entre HIS e PCR nested (Jung et al., 2004) para a detecção de *H. parasuis* em tecidos parafinizados foi bastante eficiente. Entretanto, uma alta similaridade da sonda de *H. parasuis* em relação a fragmentos correspondentes no gene 16S rRNA de *A. indolicus* e *A. minor* não exclui definitivamente o potencial de reatividade cruzada da técnica de HIS com essas bactérias. Além do mais, a especificidade da HIS em detectar *H. parasuis* para uso rotineiro em laboratórios não foi ainda completamente elucidada (Jung e Chae, 2004).

2.7. Tratamento

O uso profilático de antibióticos ou medicação terapêutica oral pode ser de pouco valor em surtos graves de *H. parasuis*. Altas doses de antibióticos podem ser administradas por via parenteral assim que se manifestem os sinais clínicos, e todos os suínos no grupo afetado, não somente aqueles que demonstram sinais clínicos, podem ser tratados (Rapp-Gabrielson et al., 2006).

As doses recomendadas de antibióticos diferem de acordo com o caráter da infecção. Altas doses são necessárias durante surtos da Doença de Glässer por causa da penetração do agente nos tecidos e fluido cérebro-espinhal e difusão nas articulações afetadas (Nicolet, 1992).

Medicação pode ser iniciada baseado na determinação de sensibilidade de amostras isoladas para antibióticos específicos. Há poucos relatos de resistência a antimicrobianos em *H. parasuis*. Isolados de *H. parasuis* da Dinamarca foram totalmente susceptíveis aos agentes antimicrobianos testados (ampicilina, ceftiofur, ciprofloxacina, eritromicina, florfenicol, penicilina, espectinomicina, tetraciclina, tiamulina, tilmicosin e trimetropim-sulfametazole) pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC) (Aarestrup et al., 2004).

Em um estudo realizado a partir de 53 amostras de *H. parasuis* isoladas em vários estados do Brasil, 100% delas foram sensíveis ao florfenicol utilizando-se o método de Kirby & Bauer, enquanto a maioria delas foram sensíveis à amoxicilina, enrofloxacina, josamicina e tetraciclina (Silva et al., 2005).

No estudo de Martín de La Fuente et al. (2007) um total de 30 isolados de *H. parasuis* da Inglaterra e 30 da Espanha foram testados também pelo teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC). Foi avaliada a susceptibilidade desses isolados a 19 dos antimicrobianos normalmente utilizados para tratar doenças respiratórias na suinocultura desses países. Todos os isolados da Inglaterra foram susceptíveis à penicilina, ceftiofur, eritromicina, tilmicosin, enrofloxacina e florfenicol, e a maioria deles foram susceptíveis aos demais antimicrobianos testados. Por outro lado, todos os isolados da Espanha foram susceptíveis somente ao florfenicol e elevadas taxas de resistência foram obtidas para penicilina, ampicilina, oxitetraciclina, eritromicina, tilmicosin, tiamulina e sulfatrimetoprim.

A política de uso de antimicrobianos em cada país pode ter um importante efeito na ocorrência de isolados resistentes. Amoxicilina oral, tanto administrada através

da água ou como aditivo alimentar pode ser a droga de escolha, mas é efetiva principalmente quando administrada antes dos sinais clínicos tornarem-se aparentes (Rapp-Gabrielson et al., 2006).

2.8. Controle, Prevenção e Imunidade

O controle de *H. parasuis* depende do diagnóstico correto do agente, adequada caracterização de amostras que estão causando doença sistêmica no rebanho, e seleção de vacina e protocolo de vacinação apropriados (Oliveira e Pijoan, 2002).

A opção entre o uso de tratamento antimicrobiano ou bacterina para o controle de um surto de doença de Glässer continua sendo uma decisão difícil para produtores, por causa das perdas econômicas causadas pelas infecções por *H. parasuis*. Embora fatores de virulência e antígenos protetores de *H. parasuis* ainda não sejam conhecidos, é amplamente aceito que existe imunidade sorotipo-específica. Prevenção contra a infecção por *H. parasuis* pode ser realizada pelo uso de vacina comercial (Riising, 1981; Solano-Aguilar et al., 1999; Bak e Riising, 2002; Baumann e Bilkei, 2002) ou vacina autógena (Smart et al., 1993; Santos, 1997; Kirkwood et al., 2001).

O Brasil já dispõe de vacinas comerciais contra a doença de Glässer, mas a diversidade genética das amostras e a baixa proteção cruzada entre sorotipos têm levado, algumas vezes, técnicos e produtores à procura de bacterinas autógenas, produzidas a partir de amostras isoladas de casos clínicos do próprio rebanho (Santos, 1997; Santos e Sobestiansky, 2007).

Os esforços investidos no desenvolvimento de vacinas efetivas contra *H. parasuis* estão centrados no desenvolvimento de imunidade cruzada, devido à variabilidade de sorotipos e alta porcentagem de isolados não sorotipáveis (Nedbalcova et al., 2006). A perda de proteção cruzada contra sorotipos

ou amostras a que os suínos são expostos pode explicar porque alguns desses produtos parecem inefetivos em certos rebanhos ou sob certas condições de campo (Rapp-Gabrielson et al., 1997).

Embora a identificação do sorotipo seja um dos critérios essenciais nos programas imunoproliféricos baseados em vacinas autógenas, é necessário considerar que mais de um sorotipo pode estar presente no rebanho e, com isso, a amostra isolada para produzir a bacterina pode não ser aquela envolvida no desenvolvimento da doença. Além disso, mais de um sorotipo patogênico pode estar envolvido no surto. Assim sendo, é recomendado o uso de amostras isoladas do cérebro para produção de vacina autógena. Amostras isoladas de articulações e infecções sistêmicas são menos adequadas. Isolados do pulmão são inadequados porque são altamente heterogêneos (Rapp-Gabrielson et al., 1997; Oliveira e Pijoan, 2002; Santos e Sobestiansky, 2007).

Segundo Miniats et al. (1991b), proteção cruzada contra o desafio homólogo e heterólogo foi obtida exclusivamente com bacterinas contendo amostras virulentas. Suínos vacinados com bacterina contendo amostras de baixa virulência foram protegidos somente contra o desafio homólogo. Entretanto, a imunogenicidade de dois isolados de *H. parasuis* sorotipo 12 indicou que até amostras virulentas podem não expressar níveis suficientes de imunógenos protetores para se produzir uma bacterina aceitável (Rapp-Gabrielson et al., 1997).

Alguns autores relatam a ocorrência de proteção após o desafio homólogo com bacterina contendo os sorotipos 2, 4, 5, 13 e 14 (Rapp-Gabrielson et al., 1997; Takahashi et al., 2001). Além disso, houve proteção cruzada após aplicação de bacterina preparada do sorotipo 4 contra desafio com sorotipo 5 (Rapp-Gabrielson et al., 1997); bacterina bivalente dos sorotipos 4 e 5

contra o desafio com os sorotipos 13 e 14 (Rapp-Gabrielson et al., 1997); e bacterina do sorotipo 5 contra o desafio com os sorotipos 1, 12, 13 e 14 (Bak e Riising, 2002).

Na suinocultura brasileira, o sorotipo 5, que é considerado o mais patogênico, tem uma participação de 10% entre sorotipos isolados. Bacterina monovalente contra *H. parasuis*, usando a amostra sorotipo 5 Nagasaki, protegeu leitões contra o desafio homólogo. Proteção homóloga e heteróloga conferida por uma bacterina trivalente de *H. parasuis* sorotipos 1, 4 e 5, protegeu contra desafio com os sorotipos 1, 4, 5 e 6. Ambas as vacinas não provocaram qualquer sinal clínico de doença nos animais desafiados, nem induziu reações indesejáveis que interferissem no desenvolvimento dos animais vacinados (Santos, 1997).

Entretanto, a correlação entre sorotipo e virulência não é evidente, e a proteção cruzada entre diferentes sorotipos e mesmo entre amostras de mesmo sorotipo é variável e difícil de prever. Além disso, há uma significativa porcentagem de isolados que não são sorotipáveis, mas que podem estar causando doença no rebanho (Rapp-Gabrielson et al., 1997). Isto torna fundamental a diferenciação de isolados de *H. parasuis* na estratégia de produção de uma vacina autógena.

2.9. Epidemiologia

Os suínos são os hospedeiros naturais para *H. parasuis*. Historicamente, a doença de Glässer era considerada uma doença esporádica de suínos jovens submetidos a estresse. Com a evolução dos sistemas de criação, com grandes populações de suínos mantidos em isolamento e com alto estado de saúde, podendo estar livres de *H. parasuis*, houve alteração no padrão de ocorrência da infecção. A introdução de *H. parasuis* nestes sistemas pode resultar em doença sistêmica com morbidade e

mortalidade altas, mesmo sem a presença de fatores de risco, afetando suínos em qualquer estágio de produção (Rapp-Gabrielson et al., 2006; Santos e Sobestiansky, 2007).

Em rebanhos convencionais que utilizam desmama precoce segregada, infecção tardia com amostra virulenta de *H. parasuis* pode ocasionar conseqüências graves se ocorrer quando a imunidade materna estiver baixa ou ausente. Deste modo, *H. parasuis* é um dos mais sérios problemas associados à mistura de suínos de diferentes rebanhos ou introdução de novos animais no rebanho (Smart et al., 1988; Solano-Aguilar et al., 1999; Oliveira e Pijoan, 2002).

O *H. parasuis* está amplamente distribuído no mundo. No Brasil, por não ter sido ainda bem estudado, desconhece-se a extensão da sua ocorrência nos rebanhos. É um dos primeiros agentes a colonizar o aparelho respiratório superior de suínos sadios de granjas convencionais e a imunidade natural desempenha importante papel para evitar que a bactéria invada os tecidos e cause doença (Santos e Sobestiansky, 2007).

2.10. Epidemiologia molecular

Técnicas de biologia molecular têm se tornado bastante integradas na prática da epidemiologia de doenças infecciosas. Epidemiologia molecular é o uso de técnicas de biologia molecular no estudo dos determinantes da ocorrência da doença e de sua distribuição em populações. Técnicas moleculares não substituem os métodos convencionais. Elas são direcionadas a questões que não são resolvidas ou então que seriam mais trabalhosas, caras, e/ou mais demoradas de serem solucionadas se fossem utilizadas técnicas convencionais (Foxman e Riley, 2001).

Está havendo uma ampliação do uso de técnicas de tipagem em microbiologia com objetivo de caracterizar corretamente as

amostras de microrganismos. As vantagens e desvantagens de uma técnica de tipagem dependem de seu poder discriminatório, reprodutibilidade, tempo e custo (Olvera et al., 2007). Um método de genotipagem com poder de reprodutibilidade e alto nível discriminatório seria ideal para estudar a epidemiologia de agentes bacterianos entre e dentro de rebanhos e para gerar dados para serem usados no controle da doença (Oliveira et al., 2004).

Atualmente, métodos de genotipagem são utilizados para classificar isolados de *H. parasuis* e estudar a epidemiologia das infecções dentro e entre rebanhos. Estes métodos podem ser utilizados para definir amostras prevalentes que afetam rebanhos suínos e para diferenciar entre amostras comensais e amostras virulentas, selecionando, assim, isolados representativos para serem utilizados em vacinas autógenas (Oliveira e Pijoan, 2002; Olvera et al., 2007).

A maioria dos estudos epidemiológicos sobre infecções por *H. parasuis* são baseados em sorotipagem (Morikoshi et al., 1990; Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson e Gabrielson, 1992; Blackall et al., 1996; Santos, 1997; Rubies et al., 1999; Rafiee e Blackall, 2000). Entretanto, a correlação entre sorotipo e virulência não é evidente, e a proteção cruzada entre diferentes sorotipos e mesmo entre amostras de mesmo sorotipo é variável e difícil de prever (Rapp-Gabrielson et al., 1997). Sorotipagem não fornece adequada discriminação de isolados para estudos epidemiológicos, e, além disso, entre 15-41% dos isolados não são tipáveis por este método (Oliveira et al., 2003). Desta forma, métodos moleculares têm sido utilizados para superar as limitações da sorotipagem em estudos epidemiológicos de infecções por *H. parasuis* (Oliveira e Pijoan, 2004a). Estes testes permitem melhor caracterização dos isolados quando comparado com sorotipagem e já foi sugerido que certos perfis de DNA podem estar associados com

virulência (Oliveira et al., 2003). Entretanto, técnicas moleculares não oferecem informações funcionais diretas, e genótipos têm que ser correlacionados com características imunológicas ou de virulência a partir de dados complementares.

2.10.1. *Restriction endonuclease fingerprinting* (REF)

A primeira técnica baseada em tipagem de DNA para *H. parasuis*, 'restriction endonuclease fingerprinting' (REF), foi desenvolvida por Smart et al. (1988). Esta técnica consiste da digestão de DNA genômico puro com endonucleases de restrição e a subsequente análise dos fragmentos através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Smart et al. (1988) utilizou tipagem por REF para identificar diferentes amostras de *H. parasuis* isoladas de rebanhos convencionais e SPF. Rebanhos convencionais apresentaram uma população mais heterogênea de amostras de *H. parasuis* quando comparado com rebanhos SPF. Tipagem por REF também foi utilizada para detectar falha vacinal em surtos da doença de Glässer. Isolados obtidos da cavidade nasal de animais saudáveis e isolados obtidos de casos clínicos da doença foram diferentes daqueles presentes em bacterinas comerciais utilizadas nos rebanhos (Smart et al., 1993). Apesar de ser um método com alto poder discriminativo, a sua interpretação é extremamente complicada.

2.10.2. *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE)

MLEE consiste da fragmentação de DNA genômico puro com diversas enzimas, tais como adenil cinase e catalase, e a subsequente análise dos fragmentos através de eletroforese em gel. Os perfis de bandas são consistentes com um *locus* para cada enzima. Blackall et al. (1997) utilizaram este mesmo método para examinar a diversidade genética presente em 40 isolados australianos de *H. parasuis*. Os resultados revelaram a existência de duas subdivisões

distintas em *H. parasuis*. Além disso, foi grande a diversidade entre os isolados, até mesmo isolados de mesmo sorotipo. Amostras isoladas de locais fora do trato respiratório estavam presentes em ambos os grupos.

2.10.3. *Restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP)

A técnica de PCR-RFLP envolve a amplificação de um gene pelo método de PCR e a digestão de produtos de PCR com endonucleases de restrição para obter um perfil de bandas. A principal vantagem é que, se o PCR for específico, elimina-se a necessidade do isolamento bacteriano e a técnica pode ser realizada diretamente de amostras clínicas. Entretanto, a utilização de um único gene faz a técnica de PCR-RFLP susceptível de ser afetada por transferência lateral de gene (De La Puente Redondo et al., 2003).

2.10.3. *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

A técnica de MLST envolve o sequenciamento de fragmentos de 450-600 pb de genes específicos e designação de perfis de alelos, que resultam em tipos de sequências (ST) (Olvera et al., 2006). A técnica de MLST tem sido utilizada com sucesso para a determinação de complexos clonais (CC) de vários patógenos humanos e animais (Cooper e Feil, 2004). Olvera et al. (2006) analisaram 11 amostras referência e 120 amostras de campo através do método MLST. Desde que a sequência genômica de *H. parasuis* não está disponível, foram utilizados iniciadores delineados para *H. influenzae* e iniciadores universais. O número de alelos por locus variou de 14 a 41. A alta heterogeneidade genética desta bactéria foi confirmada com MLST, desde que amostras foram divididas em 109 tipos de sequências, e somente 13 pequenos complexos clonais foram detectados pelo algoritmo de Burst.

2.10.4. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR)

A genotipagem de *H. parasuis* também pode ser realizada através do teste de ERIC-PCR. Esse PCR permite amplificação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos através de iniciadores ERIC e revela perfis específicos do genoma após subsequente separação por eletroforese (Rafiee et al., 2000; Ruiz et al., 2001; Oliveira et al., 2003). Diferentes perfis de DNA foram detectados por esse método mesmo em isolados de *H. parasuis* de mesmo sorotipo (Oliveira et al., 2003). Essa técnica contribui muito para a compreensão da epidemiologia de *H. parasuis*. ERIC-PCR permite a identificação da variabilidade de amostras dentro do mesmo sorotipo, sendo, desta forma, adequado para estudos epidemiológicos. Ela demonstra a alta variabilidade genética existente entre isolados de campo de *H. parasuis* e tem ajudado a identificar diferenças entre amostras isoladas de locais respiratórios e sistêmicos (Oliveira et al., 2003). Esta técnica é atualmente usada por veterinários para identificar as fontes de amostras virulentas introduzidas nos rebanhos, para detectar grupos de isolados prevalentes envolvidos em mortalidade, e para selecionar isolados para serem usados em vacinas autógenas. É uma importante ferramenta para pesquisa, prevenção e controle da infecção por *H. parasuis* (Oliveira, 2007).

As seqüências ERIC estão distribuídas aleatoriamente pelo genoma bacteriano. Estas seqüências foram, inicialmente, identificadas em espécies de *Salmonella* e *Escherichia coli*, e, por isso, receberam o nome de ‘enterobacteriaceae’ (Sarples e Lloyd, 1990). Posteriormente, descobriu-se que elas eram altamente conservadas entre as diferentes espécies bacterianas. Várias cópias de elementos ERIC, compartilhando a mesma seqüência de DNA, podem ser encontradas em um determinado genoma bacteriano, sendo, por isso, conhecidos

como elementos ‘repetitivos’. Elementos ERIC são regiões não codificadoras localizadas entre genes, isto é, em posições intergênicas. Esses elementos contêm repetições centrais invertidas altamente conservadas, que são conhecidas com ‘consensos’. Estas posições no genoma de um determinado isolado bacteriano parecem ser conservadas em amostras relacionadas. Amostras diferentes possuem distribuição diferente dos elementos ERIC em seus genomas. A amplificação através de PCR de regiões genômicas entre cópias ERIC produz um perfil de fragmentos distintos em um gel de agarose. Esses fragmentos geram uma identidade (fingerprint) genômica, que pode ser utilizada para identificar amostras relacionadas (Versalovic et al., 1991; Oliveira, 2007). A função dessas seqüências repetitivas de DNA em genomas de mamíferos permanece desconhecida (Versalovic et al., 1991).

A caracterização de novos elementos repetitivos em diferentes espécies permitirá o uso desta técnica em análise genética molecular de qualquer microrganismo. Esses produtos amplificados poderiam ser utilizados diretamente em métodos de clonagem e seqüenciamento direto para extrair informações genômicas mais rapidamente do que é possível com métodos atuais (Versalovic et al., 1991).

3. Material e Métodos

3.1. Origem do material

Foram analisados 45 isolados de campo de *H. parasuis*, provenientes do Laboratório de Diagnóstico Veterinário Microvet, da cidade de Viçosa, MG. As amostras foram isoladas de 14 rebanhos de diferentes estados brasileiros, sendo sete rebanhos de Minas Gerais, dois do Paraná, três de Santa Catarina, um do Mato Grosso e um do Mato Grosso do Sul.

Os isolados foram identificados previamente como *H. parasuis* considerando-se aspectos como morfologia, coloração pelo método de Gram, hemólise em agar sangue com hemácias de carneiro, teste de satelitismo ao *Staphylococcus aureus*, teste de cAMP e resultados negativos nos testes bioquímicos para fermentação de lactose, manitol, arabinose e rafinose e positivo para fermentação se glicose.

Trinta e um dos 45 isolados foram previamente sorotipados através da técnica de difusão em gel de agar (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992), utilizando painel de anticorpos policlonais produzidos em coelhos, e classificadas de 1 a 15 ou como não tipáveis.

3.2. Cultivo bacteriano

Estas amostras foram recebidas em placas de agar sangue com estria de *Staphylococcus aureus*. Colônias bacterianas apresentando satelitismo para *S. aureus* foram repicadas em agar Casman (Difco Laboratories, Detroit – MI, EUA), suplementado com soro fetal eqüino (5%) e β - nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (0,004%) (Sigma Chemical Company, St. Louis – MO, EUA). O agar Casman suplementado foi utilizado para evitar a contaminação das amostras com *S. aureus* e para possibilitar um maior crescimento bacteriano para extração. Para crescimento adequado, as amostras de *H. parasuis* foram colocadas em estufa, a 37°C, por 24-48 horas, em jarra contendo 10% de CO₂ e 10% de H₂ (Air Products).

3.3. Extração do DNA

O crescimento bacteriano em placas de agar Casman foi coletado utilizando-se uma alça de platina e transferido para um tubo (1,5 ml) contendo 300 μ l de PBS estéril (pH 7.0). A suspensão bacteriana foi homogeneizada utilizando-se um agitador de tubos. Uma vez homogeneizada, a suspensão bacteriana foi

centrifugada a 13.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-suspendido em 200 μ l da solução PrepMan® (PrepMan® Ultra sample preparation reagent, Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Após re-suspensão, a nova solução foi fervida durante 10 minutos e centrifugada a 13.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante contendo DNA extraído foi utilizado como produto para genotipagem por ERIC-PCR. Quantificação do DNA em cada amostra foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro (Eppendorf, BioPhotometer) com fonte de luz ultravioleta, a 260nm. O DNA de todas as amostras foi padronizado para a concentração de 100 ng/ μ l. A quantificação de DNA foi necessária para que os genótipos obtidos com a técnica de ERIC-PCR fossem comparáveis durante a fase de análise por computador. Uma vez obtidos os genótipos bacterianos, cada isolado de *H. parasuis* foi estocado em criotubos, à -80°C, em um microlitro de meio de congelamento estéril contendo 800 μ l de caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) (Difco Laboratories, Detroit – MI, EUA) e 200 μ l de glicerol.

3.4. ERIC-PCR

Os isolados de *H. parasuis* foram genotipados pelo teste de ERIC-PCR (Oliveira et al., 2003). Foram utilizados os iniciadores ERIC-1R (5'-ATgTAAgCTCCTggggATTCAC-3') e ERIC-2 (5'-AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3') (Versalovic et al. 1991). As reações de PCR foram executadas em um volume de 25 μ l, contendo 100 ng de DNA bacteriano, 1.2 μ M de cada iniciador (Tab. 1), 2,5 μ l de tampão 10x (500 mM de KCl e 100 mM de Tris-HCl) (Invitrogen Corporation), 4,5 mM de MgCl₂ (Promega Corporation), 0,23 mM de cada dNTP (Invitrogen Corporation) e 0,75 unidades de Taq DNA polimerase 500U (Ludwig). Água MiliQ autoclavada foi usada como controle negativo do PCR e a amostra de referência de *H. parasuis*

Nagasaki sorotipo 5 (Japão) foi utilizada como controle positivo. As amplificações foram realizadas em microtubos de 0,2 ml, em termociclador MiniCycler™ MJ Research. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 94°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; extensão final no último ciclo por 7 minutos, à 72°C e finalmente manutenção à 4°C. Produtos da amplificação foram separados em eletroforese em gel de agarose 2%, a 70 V em tampão Tris-acetato-EDTA, por duas horas. O marcador de peso molecular Hi-Lo™ DNA Marker (Minnesota Molecular, Minneapolis, Minn.) foi incluído como um peso de referência. Os géis foram corados com brometo de etídeo e, posteriormente, fotografados pelo programa LISCAP Image Capture Software for ImageMaster® VDS System, Pharmacia Biotech.

3.5. Análise dos perfis obtidos

As fotos dos géis foram incluídas no programa BioNumerics versão 5 (Applied Maths, Bélgica) para serem analisadas. As linhas contendo os genótipos e marcadores de peso molecular foram identificados. Os marcadores moleculares (Hi-Lo™ DNA Marker) foram colocados na primeira e última linha do gel e foram usados para alinhar ou 'normalizar' a figura do gel. Este mesmo marcador foi adicionado como 'referência' na base de dados, sendo que, cada novo gel que fosse analisado seria ajustado ao sistema referência da base de dados. Este procedimento corrige pequenas diferenças entre géis e permite comparações entre eles (Oliveira, 2007). Foi utilizado um controle positivo (amostra de referência Nagasaki, sorotipo 5 (Japão), com 'fingerprint' genômico conhecido, em cada reação de PCR para assegurar a reproducibilidade do método. Todo controle positivo de uma reação foi comparado com o controle positivo da reação anterior na base de dados, e a reação de PCR foi, então,

aceita ou excluída ao se comparar a presença, ausência, e intensidade de bandas dos controles positivos obtidos em cada corrida. Desta forma, a foto do gel foi padronizada e curvas densitométricas foram geradas para cada banda. Os genótipos foram organizados em dendrogramas para avaliação da relação genética entre as cepas utilizadas. Os genótipos obtidos foram comparados com base no cálculo de matrizes de similaridade de curvas densitométricas utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. Os dendrogramas foram calculados utilizando-se o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) (Oliveira et al., 2003)

3.6. Índice de diversidade

O índice de diversidade de Simpson (D) foi calculado segundo Hunter e Gaston (1988) para os 32 isolados sorotipados, para os 45 isolados genotipados e para os 32 isolados que foram tipados por ambos os métodos. O índice de diversidade é a probabilidade média que um método de tipagem utilizará para designar um tipo distinto para duas amostras não relacionadas, escolhidas aleatoriamente em uma população microbiana de uma determinada espécie (Hunter e Gaston, 1988).

4. Resultados e Discussão

4.1. Diferenciação de amostras

Vinte e dois genótipos distintos (I – XXII) foram identificados entre os 45 isolados analisados, pela comparação de perfis de bandas obtidos com a técnica de ERIC-PCR, utilizando-se o programa BioNumerics (Tab. 1). O índice de diversidade calculado para as 32 amostras sorotipadas apresentou um valor baixo ($D=0,67$), o que se deve ao fato da técnica de sorotipagem ser pouco discriminatória. Por outro lado, a técnica de ERIC-PCR foi altamente discriminatória, com um índice de diversidade de $D=0,95$. Quando calculamos o índice de diversidade

para a combinação das informações de sorotipagem e genotipagem, observamos um valor ligeiramente maior ($D=0,967$), o que sugere que esta combinação seria mais discriminatória. Entretanto, devido ao pequeno ganho da utilização desta combinação associado às dificuldades de realização da sorotipagem, a utilização

apenas da genotipagem possa ser mais adequada.

O ponto de corte de 90% foi utilizado como padrão para a diferenciação de amostras nos dendrogramas construídos, baseado no ponto de corte do controle positivo (Fig.1).

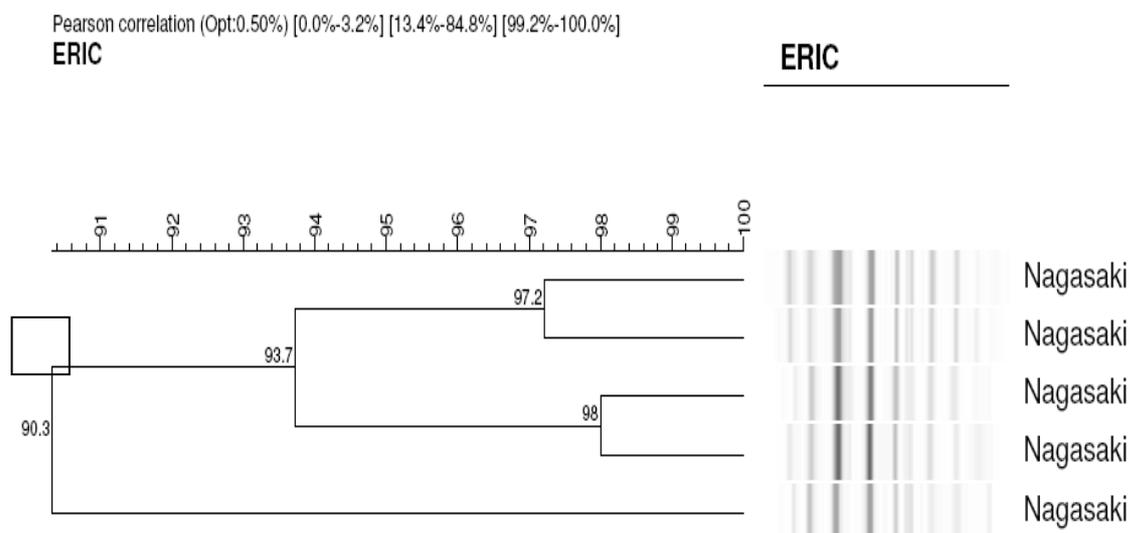


Figura 1: Dendrograma, calculado pelo método UPGMA, do controle positivo (Nagasaki), adicionado às reações de ERIC-PCR realizadas neste estudo. O perfil genômico destas amostras apresentou 90,3% de similaridade.

Tabela 1. Amostras de *Haemophilus parasuis*, sorotipo, rebanho e estado de origem, ano de isolamento, material clínico de onde cada amostra foi isolada e genótipo.

Seqüência	Identificação da Amostra	Sorotipo	Rebanho	Estado	Ano de isolamento	Isolado de:	Genótipo
1	1734	- ^a	B	MG	2000	Focinho	I
2	4055	-	B	MG	2004	Pulmão	I
3	5709	-	B	MG	2006	Pulmão	I
4	5777	-	B	MG	2006	Pulmão	I
5	4363	6	F	MG	2005	Swab nasal	I
6	4387	NT ^b	F	MG	2005	Swab nasal	II
7	2564	9	C	MS	2002	Focinho	II
8	1750	-	A	MG	2000	Brônquio	III
9	1751	-	A	MG	2000	Brônquio	III
10	3729	4	E	MG	2004	Pulmão	III
11	1730	-	A	MG	2000	Brônquio	III
12	4397	4	A	MG	2005	Focinho	III
13	1791	-	B	MG	2000	Brônquio	IV
14	5661	5	F	MG	2006	Pleurisia	IV
15	5268	5	F	MG	2006	Pericárdio	IV
16	4362	5	F	MG	2005	Swab nasal	IV
17	5795	1	B	MG	2006	Pulmão	V
18	6000	NT	F	MG	2006	Brônquio	V
19	4514	14	L	PR	2005	Pulmão	V
20	5842	NT	F	MG	2006	Pulmão	VI
21	4388	4	F	MG	2006	Swab nasal	VI
22	5758	NT	H	MG	2006	Brônquio	VII
23	5809	NT	H	MG	2006	Pulmão	VII
24	6128	NT	L	PR	2007	Brônquio	VIII
25	6195	NT	L	PR	2007	Cérebro	VIII
26	5212	NT	M	PR	2005	Pericardite	IX
27	6920	NT	M	PR	2007	Pulmão	IX
28	6919	NT	M	PR	2007	Pulmão	IX
29	6084	NT	N	SC	2006	Brônquio	IX
30	6455	NT	N	SC	2007	Pericardite	IX
31	3776	-	K	SC	2004	Pulmão	X
32	5159	-	M	PR	2005	Focinho	X
33	5162	-	M	PR	2005	Brônquio	X
34	5653	12	B	MG	2006	Pulmão	XI
35	5889	NT	I	MT	2006	Brônquios	XII
36	5205	2	G	MG	2005	Pulmão	XIII
37	4956	-	A	MG	2005	Cérebro	XIV
38	6156	2	J	MG	2007	Pulmão	XV
39	6151	NT	L	PR	2007	Brônquios	XVI
40	2864	-	D	SC	2003	---	XVII
41	5490	2	G	MG	2006	Brônquios	XVIII
42	6020	NT	F	MG	2006	Pulmão	XIX
43	5594	NT	F	MG	2006	Pulmão	XX
44	5883	NT	G	MG	2006	Brônquios	XXI
45	5574	NT	F	MG	2006	Pulmão	XXII

^a dado não disponível; ^b não sorotipável

4.2. Diversidade genética dentro de grupos de sorotipos

Os 32 isolados de *H. parasuis* que foram previamente sorotipados apresentaram oito diferentes sorotipos (1, 2, 4, 5, 6, 9, 12 e 14). Os sorotipos 2 (9,37%), 4 (9,37%) e 5 (9,37%), foram os mais freqüentes, com três isolados cada um. Estes sorotipos, com exceção do sorotipo 2, também foram os mais freqüentes no estudo de Santos (1997), que, juntamente com os sorotipos 1 e 12, representaram 47,4% do total de isolamentos daquele autor. Dezoito isolados (56,25%) não reagiram a nenhum dos soros contra os 15 sorotipos conhecidos de *H. parasuis*, sendo, então, classificados como não sorotipáveis (NT). Por outro lado, verificamos uma grande divergência em relação ao estudo de Santos (1997) que apresentou apenas 8,4% dos isolados de campo não sorotipáveis. Essa diferença pode ser devido ao fato de o trabalho de Santos (1997) ter sido realizado a mais de dez anos e, durante este longo período, o perfil das amostras de *H. parasuis* pode ter mudado.

Estes 18 isolados NT de *H. parasuis* seriam considerados clones se fosse utilizada somente a técnica de sorotipagem para caracterizá-los. Porém, a única característica comum entre eles é o fato de não terem reagido com nenhum dos soros específicos para os 15 sorotipos oficialmente reconhecidos (Rafiee et al., 2000). Estas amostras NT apresentaram alta diversidade genética, com treze genótipos distintos (Fig. 2). A alta proporção de isolados não sorotipáveis e a considerável diversidade genética entre os isolados de mesmo sorotipo são algumas das limitações da sorotipagem que foram superadas pela técnica de ERIC-PCR. Nossos dados indicaram que o teste de ERIC-PCR fornece mais acurácia na diferenciação de amostras, especialmente dentre as amostras não sorotipáveis.

Diferentes genótipos também foram observados dentro do grupo do sorotipo 2 e do grupo do sorotipo 4, com três e dois genótipos distintos, respectivamente. Ao contrário, os isolados do sorotipo 5 apresentaram o mesmo perfil de bandas constituindo o grupo genotípico IV. É interessante notar também que as amostras de sorotipo 5/genótipo IV estão presentes apenas no rebanho F e, como o sorotipo 5 é considerado de alta patogenicidade, este isolado poderia estar ocasionando problemas clínicos neste rebanho (Tab. 2), (Fig. 3). Há estudos baseados em infecção experimental que associaram determinados sorotipos com patogenicidade ou não dos isolados (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992). Entretanto, apesar de verificarmos que o genótipo IV está relacionado apenas com isolados de sorotipo 5, não podemos relacionar este genótipo com potencial patogênico.

Diversos trabalhos também observaram considerável diversidade genética entre isolados de *H. parasuis* de mesmo sorotipo. Blackall et al. (1997) estudaram a diversidade de 40 isolados australianos e 8 amostras de referência de *H. parasuis* por meio do teste MLEE (multilocus enzyme electrophoresis). Trinta e quatro tipos foram reconhecidos, apresentando considerável diversidade entre isolados de mesmo sorotipo, o que levou os autores a cogitarem a possibilidade de a população de *H. parasuis* possuir mais de uma única espécie ou subespécie.

Pearson correlation (Opt:0.50%) [0.0%-3.2%] [13.4%-84.8%] [99.2%-100.0%]
ERIC

ERIC

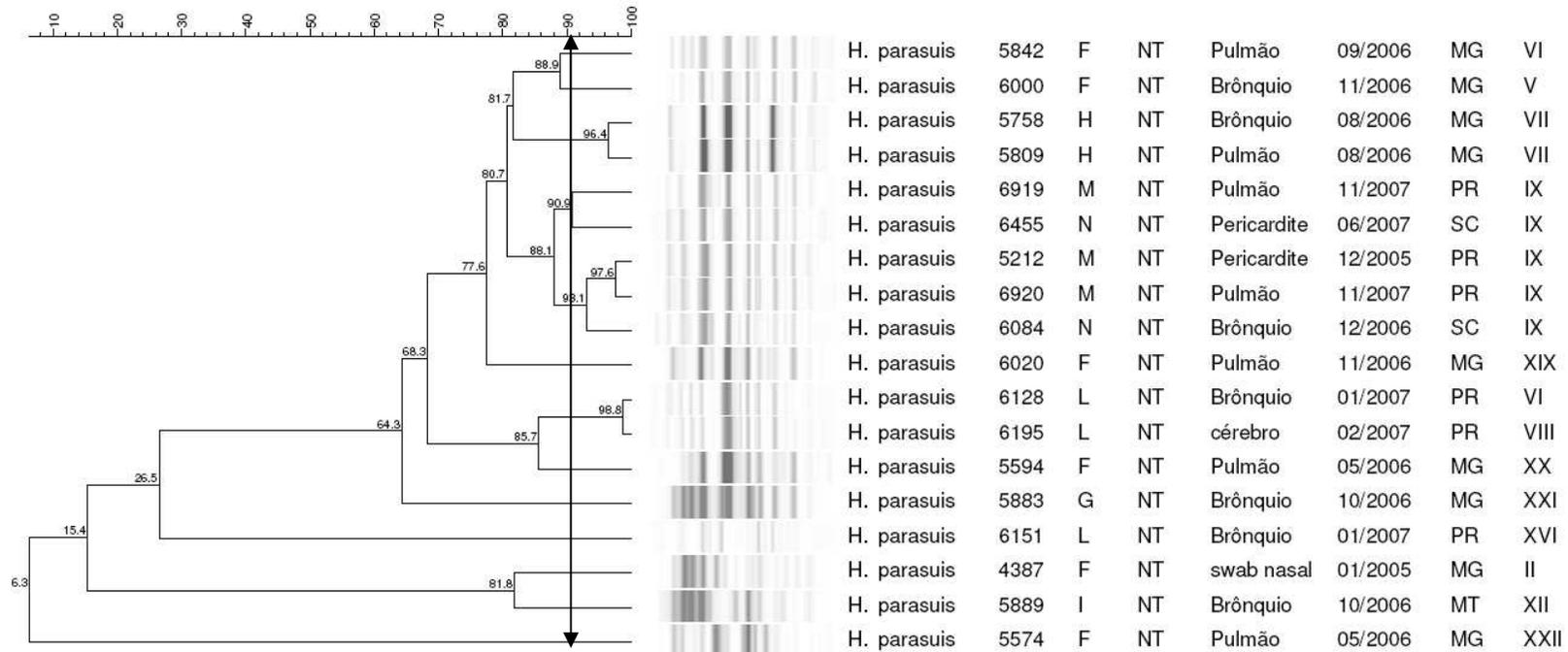


Figura 2: Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, apresentando as amostras não sorotipáveis (NT). Estas amostras apresentaram 13 genótipos distintos, baseados no ponto de corte de 90% (seta) e foram isoladas de diferentes rebanhos de diversos estados brasileiros.

Pearson correlation (Opt:0.50%) [0.0%-3.2%] [13.4%-84.8%] [99.2%-100.0%]
ERIC

ERIC

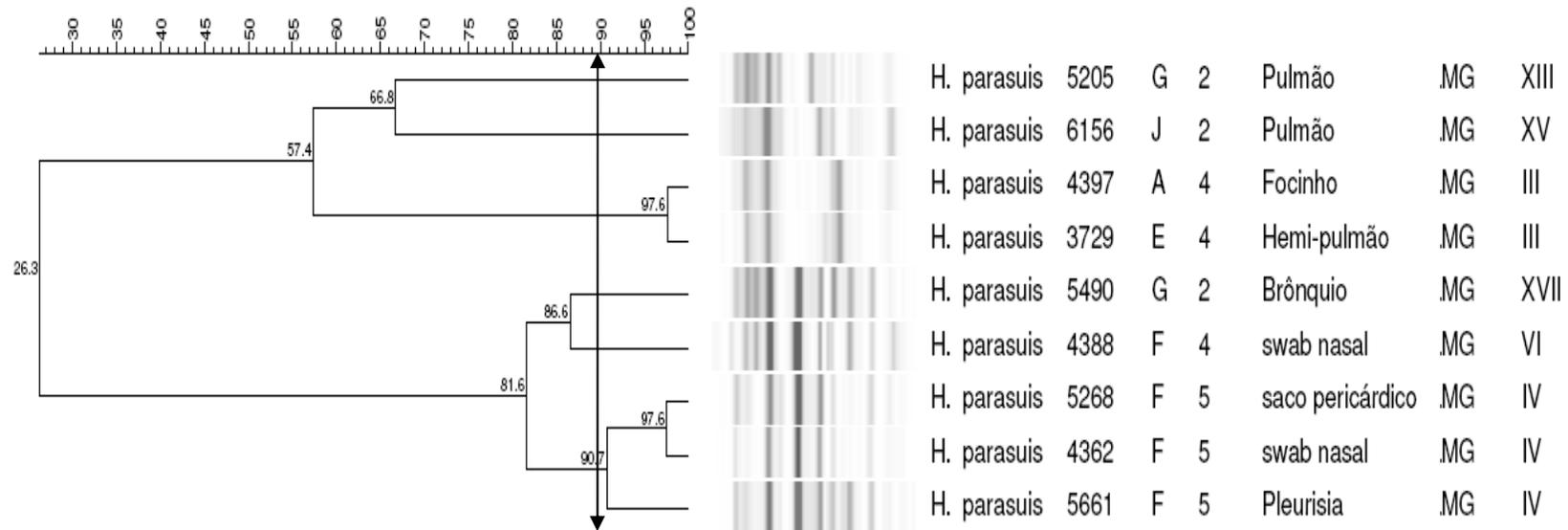


Figura 3: Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, apresentando os sorotipos 2, 4 e 5, demonstrando três diferentes genótipos para os sorotipo 2, dois diferentes genótipos para o sorotipo 4 e a clonalidade das amostras sorotipo 5 baseados no ponto de corte de 90% (seta). Os isolados de sorotipo 5/genótipo IV pertencem ao mesmo rebanho.

Rafiee et al. (2000) ao compararem 12 isolados não sorotipáveis de *H. parasuis* entre três rebanhos distintos, perceberam que o método de ERIC-PCR foi capaz de determinar a conexão entre surtos nesses três rebanhos. Os genótipos apresentados por este método forneceram forte evidência de que três surtos, nas três diferentes propriedades, foram causados pela mesma amostra, indicando que, neste caso, os isolados NT eram idênticos. Entretanto, somente com a sorotipagem não seria possível fazer tal afirmação. ERIC-PCR, ao contrário, não é afetado pelo problema das amostras NT, já que todos os isolados podem ser analisados por este método. Além disso, o método de ERIC-PCR forneceu informações de grande valor para que pudessem ser planejados programas efetivos de prevenção e controle da infecção por *H. parasuis*.

Oliveira et al. (2003), caracterizaram a diversidade genética de isolados de campo de *H. parasuis* dos Estados Unidos, entre 1999 e 2001, relacionando-os ao sorotipo, rebanho de origem e local de isolamento. Neste estudo detectaram que isolados do sorotipo 4 e NT foram os mais prevalentes naquele país. Identificaram 34 genótipos diferentes entre os 98 isolados, utilizando um ponto de corte de 90% de similaridade. Estes isolados de sorotipo 4 e NT tiveram alta diversidade genética (12 e 18 genótipos, respectivamente). Além disso, a maioria dos isolados de *H. parasuis* que apresentaram genótipos similares pertenciam ao mesmo sorotipo. Havendo, entretanto, alguns isolados que apresentaram genótipos similares e diferentes sorotipos. Já no presente trabalho, o genótipo não foi um bom indicador do sorotipo das amostras analisadas, com exceção das amostras de sorotipo 5 que formaram o grupo de genótipo IV e foram isoladas do mesmo rebanho.

A perda de associação entre genótipo e sorotipo pode ser atribuída a vários fatores.

As amostras estudadas foram previamente sorotipadas através da técnica de difusão em gel de agar. Para produção do anti-soro foram utilizadas as amostras referência dos 15 sorotipos oficialmente reconhecidos. Como estas amostras referência são provenientes de outros países, tais como, Japão, Suíça, Suécia, Alemanha e Estados Unidos (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992) o sorotipo de alguns dos isolados analisados, provenientes de propriedades brasileiras, pode não ter sido corretamente identificado pela técnica de sorotipagem utilizada. Além disso, podem ter sido realizadas passagens seriadas *in vitro* o que pode permitir a seleção de clones não encapsulados de *H. parasuis*, sendo a cápsula um importante fator de virulência dos membros do gênero *Haemophilus* (Morozumi e Nicolet, 1986a). Esta poderia ser uma das possíveis justificativas para o presente trabalho, uma vez que foi encontrado um elevado percentual de isolados não tipáveis.

Informações fornecidas por testes de sorotipagem podem ser utilizadas para selecionar vacinas comerciais ou autógenas para o controle de infecções por *H. parasuis*. Entretanto, os resultados do estudo de Rapp-Gabrielson et al. (1997) sugerem a perda de proteção cruzada entre diferentes amostras do mesmo sorotipo. Uma caracterização eficiente de isolados é essencial para seleção de amostras para inclusão em vacinas autógenas. Desta forma, genotipagem de isolados de campo por ERIC-PCR pode fornecer mais acurácia na diferenciação de isolados, independentemente do sorotipo (Oliveira et al., 2003).

4.3. Diversidade genética dentro e entre rebanhos

Em oito dos quatorze rebanhos, dois ou mais isolados foram obtidos dos animais afetados, embora uma ou duas amostras por rebanho predominasse. Os resultados de genotipagem nos rebanhos A e B (genótipos III e I, respectivamente) demonstram que algumas

amostras podem permanecer nas populações suínas por mais de seis anos. Apesar disso, novas amostras podem ainda surgir nessas populações. No rebanho M, a amostra do genótipo IX estava presente em 2005, sendo detectado novamente em 2007 (Tab. 2).

As três amostras de genótipo V, apesar de serem clones, foram isoladas de três rebanhos distintos (B, F e L), sendo dois rebanhos de Minas Gerais e um do Paraná. Além disso, são de três sorotipos diferentes (1 e 14 e NT) e foram isoladas dos pulmões e brônquios (Tab.2). Estes são bons exemplos de propriedades onde a genotipagem associada a informações sobre proximidade ou não entre rebanhos, bem como movimentação de animais, poderia auxiliar na compreensão da epidemiologia da enfermidade. Não foi possível obter informações sobre a relação existente entre esses rebanhos, para que pudesse ser estabelecida algum tipo de associação epidemiologia.

No estudo de Smart et al. (1988) foi avaliada a ocorrência e distribuição de vários isolados de *H. parasuis* envolvidos em doença em rebanhos específicos através da análise de REF (Restriction Endonuclease Fingerprinting). Comparação entre amostras isoladas de rebanhos convencionais e SPF (specific pathogen-free) revelou que esses rebanhos foram afetados por diferentes amostras de *H. parasuis*, o que sugere que a origem dos suínos pode influenciar a distribuição de amostras patogênicas.

No estudo de Oliveira et al. (2003), ao avaliarem a distribuição de sorotipos de *H. parasuis* entre rebanhos, diferentes rebanhos

foram afetados por diferentes amostras do sorotipo 4. Resultados similares foram observados para os sorotipos 2 e 12. Esses achados realçaram uma importante característica epidemiológica das infecções por *H. parasuis* entre rebanhos não relacionados, que pode ter algumas implicações no controle da doença. Sabe-se que não há uma vacina eficiente de amplo espectro para controlar tais infecções e que resultados de vacinas comerciais são geralmente inconsistentes entre rebanhos. Estes resultados podem estar associados com perda de proteção cruzada entre amostras de *H. parasuis*, inclusive em relação ao mesmo sorotipo (Rapp-Gabrielson et al., 1997), provavelmente devido ao fato de estas amostras serem geneticamente diferentes, como demonstram alguns trabalhos (Blackall et al., 1997; Oliveira et al., 2003), inclusive o presente estudo. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar as implicações da variabilidade genética na proteção cruzada.

O rebanho F, com 11 isolados avaliados, teve os perfis genéticos mais diversos, com oito amostras diferentes identificadas entre 2005 e 2006, além de três sorotipos distintos, incluindo isolados não sorotipáveis (Fig. 4). Os demais rebanhos com mais de um isolado, tiveram amostras tanto com 1, 2 ou 3 sorotipos identificados, também incluindo isolados NT. Cinco desses rebanhos (35,7%) foram afetados por dois ou mais genótipos. Nestes casos, observamos uma alta diversidade de amostras de diversos sorotipos e genótipos nos diferentes rebanhos, não sendo possível estabelecer um padrão.

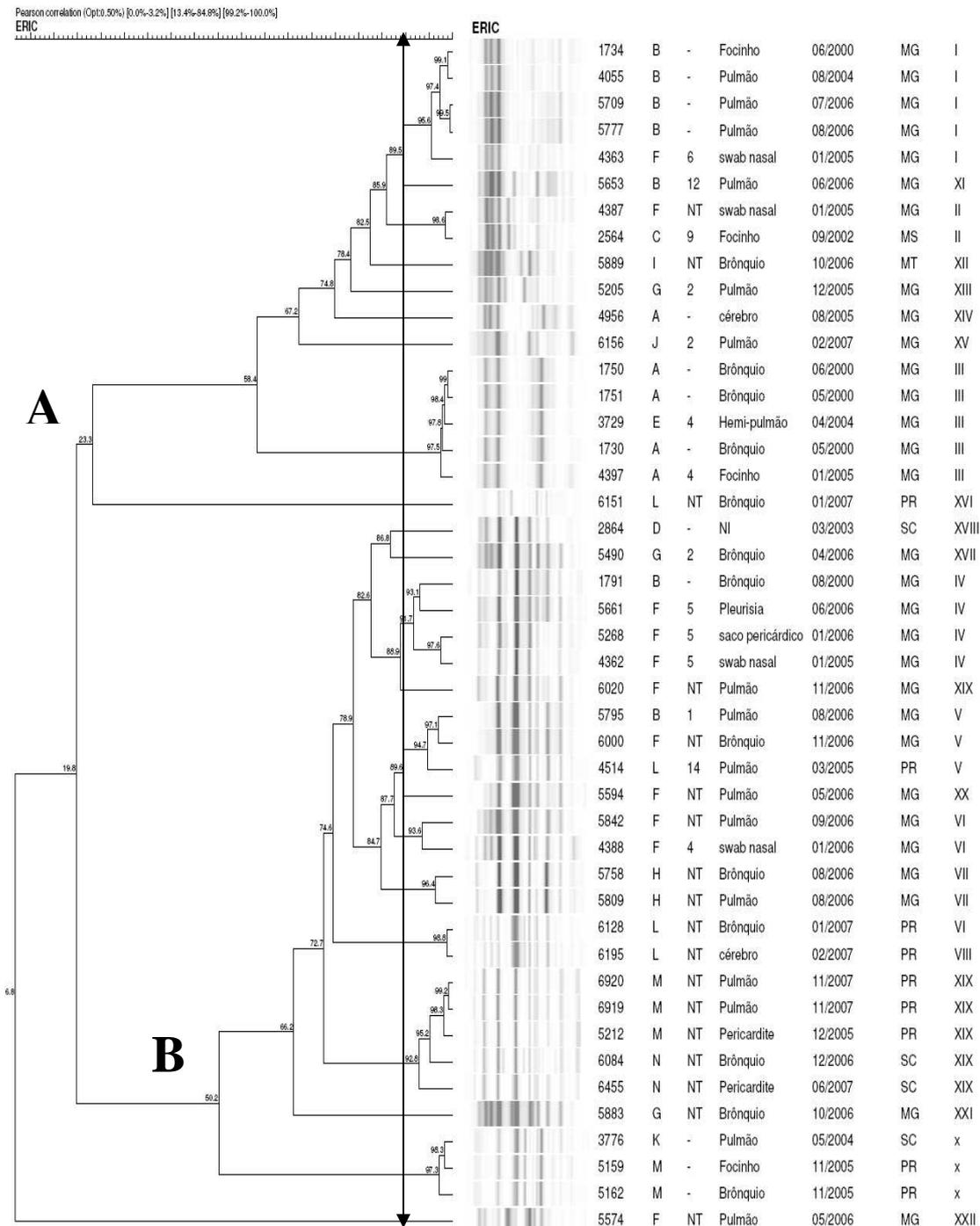


Figura 4: Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, apresentando as 45 amostras de *H. parasuis* identificadas, o rebanho e estado de origem, a data de isolamento, o sorotipo e o genótipo segundo o ponto de corte de 90% (seta). Dois grupos principais (A e B) estão indicados.

Através da análise dos resultados, a grande heterogeneidade de amostras do rebanho F poderia ser devido ao fato de tal propriedade receber animais de diversos fornecedores, e talvez até pudesse existir algum tipo de relação entre o rebanho F e o rebanho B, já que amostras de genótipos I e IV estão presentes somente nestes dois rebanhos e poderiam ser responsáveis pela ocorrência de surtos da doença. Como o ERIC-PCR é um método de tipagem rápido, relativamente barato, e já está padronizado para o *H. parasuis*, associado às informações epidemiológicas das propriedades acometidas, o laboratório poderá investigar surtos locais provocados pelo *H. parasuis*, ajudando no controle da doença e na produção de vacinas autógenas eficientes.

Amostras não sorotipáveis de *H. parasuis* tiveram alta variabilidade genética dentro de rebanhos, com dois (rebanho M) e seis (rebanho F) isolados NT diferentes, provenientes de um único rebanho. O genótipo IX, composto por cinco isolados NT, foi identificado apenas nos rebanhos M e N. Neste caso, a distribuição destas amostras foi rebanho específica (Fig. 5).

4.4. *Diversidade genética das amostras em relação ao sítio de isolamento*

Quarenta e quatro dos 45 isolados analisados possuem informação sobre o sítio de isolamento. Na figura 4 podemos observar dois grupos genéticos principais de amostras, denominados grupo A e grupo B. Alguns estudos anteriores (Smart et al., 1988 e 1993; Ruiz et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Olvera et al., 2007), após genotipagem de *H. parasuis*, verificaram que alguns agrupamentos genéticos estavam associados a amostras isoladas de lesões de doença de Glässer e outros estavam relacionados a

amostras isoladas da cavidade nasal de suínos saudáveis. Já no presente estudo, existem isolados do trato respiratório e de sítios fora do sistema respiratório nos dois grupos principais de amostras. Desta forma, não foi possível associar agrupamento genético com virulência do isolado. Apesar disso, foi possível verificar que o grupo genético B contém cinco dos seis isolados de sítios não respiratórios, juntamente com as três amostras de sorotipo 5, considerado de alta patogenicidade. Além disso, a maioria dos isolados NT (14/18) também está presente neste grupo, mas muito pouco se conhece sobre a relação destes isolados com virulência. Resultado semelhante foi relatado por Blackall et al. (1997) que também não conseguiram associar agrupamento genético com sítio de isolamento, após analisarem isolados de *H. parasuis* obtidos de locais respiratórios e fora do sistema respiratório, através da técnica de MLEE.

Outros trabalhos demonstraram resultados diferentes. Smart et al. (1988; 1993) não encontraram perfis comuns entre isolados fora do sistema respiratório de animais apresentando sinais clínicos de Doença de Glässer e isolados da cavidade nasal de animais saudáveis, pela técnica de REF. Ruiz et al. (2001) e Oliveira et al. (2003), após avaliação por ERIC-PCR de perfis genômicos de amostras de *H. parasuis*, demonstraram que isolados respiratórios e de fora do sistema respiratório tenderam a ser colocados em grupos genotípicos distintos, indicando que amostras virulentas poderiam ser clones. Olvera et al. (2007) demonstraram perfil idêntico de bandas entre isolados da cavidade nasal de suínos, também utilizando genotipagem por ERIC-PCR.

Pearson correlation (Opt:0.50%) [0.0%-3.2%] [13.4%-84.8%] [99.2%-100.0%]

ERIC

ERIC

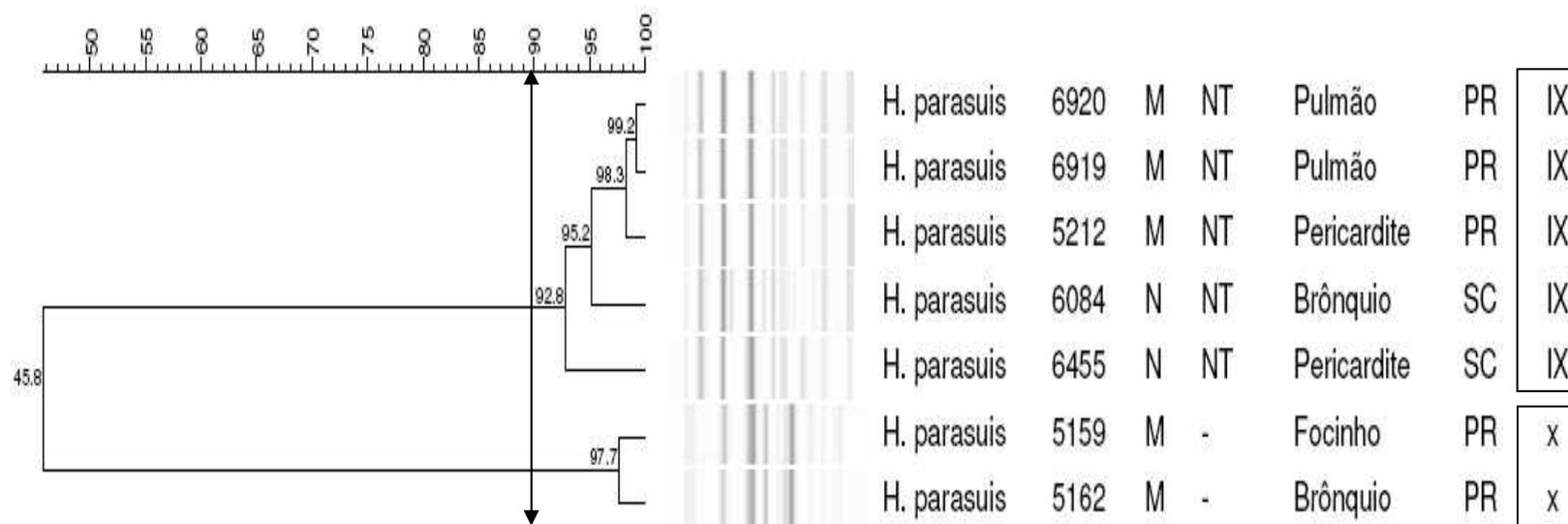


Figura 5: Dendrograma relativo à técnica de ERIC-PCR, calculado pelo método UPGMA, representando os rebanhos M e N e demonstrando a distribuição rebanho-específica para as amostras de genótipo IX e X. A seta indica o ponto de corte de 90%.

Esta discrepância de resultados entre trabalhos pode ser devido a vários fatores. O número de isolados de *H. parasuis* estudados foi bastante diferente entre estudos. No presente trabalho, 45 isolados de *H. parasuis* foram caracterizados e comparados, enquanto Smart et al. (1988; 1993) avaliaram 12 e 69 isolados, respectivamente, Ruiz et al. (2001) avaliaram 53 isolados, Oliveira et al. (2003), 98 isolados e Olvera et al. (2007), 25 isolados. Além disso, houve diferenças quanto à técnica de comparação adotada, o método de comparação (manual ou computadorizada), e ao laboratório que em foram realizadas as análises.

Os isolados do trato respiratório apresentaram ampla variedade de sorotipos (Tab.2), enquanto isolados de locais não respiratórios apresentaram apenas amostras de sorotipo cinco e NT. A maioria dos

isolados NT (15/18) estão presentes no grupo B do dendrograma (Fig. 4). Somente um isolado NT foi obtido da cavidade nasal (grupo A), enquanto os demais foram isolados de brônquios, pulmões, cérebro e lesões de pericardite (grupo B). Em uma pesquisa recente sobre amostras isoladas de rebanhos norte americanos, amostras NT fora isoladas tanto de locais não respiratórios quanto do trato respiratório superior (Oliveira et al., 2003). Desta forma, em adição aos 15 sorotipos, também permanece incerta a relação de isolados NT com virulência. Por outro lado, a diversidade genética entre as amostras estudadas foi ampla, independente do local de isolamento, já que isolados do trato respiratório apresentaram 21 dos 23 genótipos detectados, e as seis amostras isoladas de locais sistêmicos apresentaram quatro genótipos distintos.

Tabela 2: Distribuição de sorotipos por sítio de isolamento entre 44 isolados de *H. parasuis* obtidos de 14 rebanhos.

Sítio de isolamento	Sorotipo										Total	
	1	2	4	5	6	9	12	14	NT	-*		
Trato respiratório superior			2	1	1	1				1	2	8
Brônquio		1								7	4	13
Pulmão	1	2	1				1	1		7	4	17
Saco pericárdico				1								1
Pericardite										2		2
Pleurisia				1								1
Cérebro										1	1	2
Total												44

*- Não testadas

As amostras de genótipo II foram isoladas somente do trato respiratório superior (grupo A). Estas amostras, apesar de serem clones, diferem quanto ao sorotipo, sendo uma do sorotipo 9 e a outra NT. O fato de terem sido isoladas do trato respiratório superior indica que podem ser de baixa virulência. Além disso, isolados do sorotipo 9 foram considerados não patogênicos ou de baixa

patogenicidade (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992). Em locais fora do sistema respiratório, tais como pericárdio, pleura e cérebro, foram isolados os sorotipos 5 e NT. Entretanto, o sorotipo 5, reconhecido como o mais patogênico (Kielstein e Rapp-Gabrielson, 1992), foi isolado também da cavidade nasal.

Já no trabalho de Oliveira et al. (2003), as amostras de *H. parasuis* isoladas do trato respiratório superior eram tanto do sorotipo 3 quanto NT, sendo que isolados do sorotipo 3 também foram considerados não patogênicos ou de baixa patogenicidade por Kielstein e Rapp-Gabrielson (1992). Amostras potencialmente virulentas (isolados de locais não respiratórios) foram tanto dos sorotipos 1, 2, 4, 5, 12, 13 ou 14, ou NT. Estes dados sugeriram que estes isolados podem ser potencialmente patogênicos. Além disso, os isolados de *H. parasuis* obtidos do trato respiratório superior diferiram consideravelmente dos isolados de pulmão com pneumonia e de locais sistêmicos.

Em outros estudos (Smart et al., 1988, 1993) foi observado que o perfil REF de organismos associados com casos da doença de Glässer foi diferente daquele associado com os isolados obtidos de swab nasal de suínos clinicamente saudáveis. Ainda não se sabe se animais podem transportar amostras patogênicas de forma subclínica e, se forem capazes, de qual região do corpo elas poderiam ser isoladas. A obtenção de *H. parasuis* de suabes nasais vai indicar a presença deste organismo dentro de um rebanho, mas não determina se estas são as amostras que estão envolvidas no surto da doença (Smart et al., 1993).

Rapp-Gabrielson e Gabrielson (1992) avaliaram a relação entre sorotipo e sítio de isolamento e relataram que houve um aumento na frequência dos sorotipos 4 e 5 entre isolados de suínos com polisserosite. Entretanto, todos os sorotipos identificados entre as amostras analisadas foram detectados em suínos com polisserosite, e os dados não indicaram uma associação entre sorotipo, local de isolamento, ou potencial patogênico.

No presente estudo, os perfis de ERIC-PCR para isolados de *H. parasuis* foram altamente heterogêneos, mas os

‘fingerprints’ foram ideais para definir a variabilidade de amostras dentro e entre rebanhos brasileiros. Além disso, simples géis de agarose são suficientes para separar os produtos do ERIC-PCR, o que faz com que o procedimento seja rápido. Com informações epidemiológicas essenciais, esta técnica pode ser usada para identificar a origem de amostras virulentas introduzidas no rebanho, para detectar grupos prevalentes de amostras envolvidas em mortalidade, e para selecionar amostras para serem usadas na fabricação de vacinas autógenas para o controle da doença em rebanhos brasileiros.

5. Conclusões

A genotipagem por ERIC-PCR forneceu uma caracterização adequada dos 45 isolados de *H. parasuis*, sendo altamente discriminatória devido à alta diversidade genética das amostras dentro e entre grupos de sorotipos e de isolados não sorotipáveis, e também dentro e entre rebanhos e sítios de isolamento.

A utilização desta técnica por médicos veterinários permitirá uma evolução significativa no conhecimento da epidemiologia da doença.

6. Referências Bibliográficas

- AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; ANGEN, Ø. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet. Microbiol.*, v.11, n.2, p. 143-146, 2004.
- 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.
- AMANO, H.; SHIBATA, M.; TAKAHASHI, K. et al. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. *J. Vet. Med. Sci.*, v.59, n.6, p. 451-455, 1997.
- BAK, H.; RIISING, H. J. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet. Rec.*, v.151, n.17, p. 502-505, 2002.
- BAUMANN, G.; BILKEI, G. Effect of vaccination sows and their piglets on the development of Glässer's disease induced by a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5. *Vet. Rec.*, v.151, n.1, p. 18-21, 2002.
- BIBERSTAIN, E. L.; WHITE, D. C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J. Med. Microbiol.* v.2, n.1, p.75-78, 1969.
- BLACKALL, P. J.; RAPP-GABRIELSON, V.J.; HAMPSON, D. J. et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. *Aust. Vet. J.* v.73, n. 3, p.93-95, 1996.
- BLACKALL, P. J.; TROTT, D. J.; RAPP-GABRIELSON, V.J. et al. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Vet. Microbiol.* v.56, n.1-2, p.125-134, 1997.
- COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol.*, v.12, n.8, p.373-377, 2004.
- DE LA PUENTE REDONDO, V. A.; MENDEZ, J. N.; BLANCO, N. G. et al. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. *Vet. Microbiol.*, v.92, n. 8, p. 253-262, 2003.
- DEL RIO, M. L.; GUTIERREZ, C. B.; RODRIGUEZ, E. F. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* v.41, n.2, p.880–882, 2003.
- FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: Focus on infection. *Am. J. Epidemiol.* V.153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.
- HOEFLING, D. C. Acute myositis associated with *Haemophilus parasuis* in primary SPF sows. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.3, n.4, p. 354-355, 1991.
- HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* V.26, n.11, p. 2465-2466, 1988.
- INZANA, T. J.; CORBEIL, L. *Haemophilus*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. et al. 3th Edition. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Blackwell Publishing, 2004. P. 243-257.
- JUNG, K.; CHAE, C. In-situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in naturally infected pigs. *J. Comp. Pathol.* V.130, n.4, p.294–298, 2004.
- JUNG, K.; HA, Y.; KIM, S.H. et al. Development of polymerase chain reaction

- and comparison with in situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Med. Science*, v.66, n.7, p. 841–845, 2004.
- 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.
- KIRKWOOD, R. N.; RAWLUK, S. A.; CEGIELSKI, A. C. et al. Effect of pig age and autogenous vaccination on nasal mucosal colonization of pigs by *Haemophilus parasuis*. *J. Swine Health Prod.*, v.9, p. 77-79, 2001.
- LICHTENSTEIGER, C. A.; VIMR, E. R. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol. Lett.* V. 152, n.2, p. 269-274, 1997.
- LICHTENSTEIGER, C. A.; VIMR, E. R. Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* V.93, n. 1, p. 79-87, 2003.
- LIN, B. C. A novel approach to characterize *Haemophilus parasuis* field isolates using PCR assay for detecting a neuraminidase gene and using a spot test for estimating the neuraminidase activity expressed by the isolate. In: AMERICAN ASSOCIATION SWINE VETERINARY. CONGRESS, 2005, Moines, Iowa. *Proceedings...* 2005, p. 227-232.
- MARTÍN DE LA FUENTE, A. J.; TUCKER, A. W.; NAVAS, J. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Vet. Microbiol.*, v.120, n. 1-2, p.184-191, 2007.
- MINIATS, O. P.; SMART, N. L.; EWERT, E. et al. Vaccinations of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Vet. Res.*, v.55, n.1, p. 33-36, 1991a.
- MINIATS, O. P.; SMART, N. L.; ROSENDAL, S. et al. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. *Can. J. Vet. Res.*, v.55, n.1, p. 37-41, 1991b.
- MORIKOSHI, T.; KOBAYASHI, K.; KAMINO, T. et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.56, n.3, p.667-669, 1990.
- MOROZUMI, T., NICOLET, J. Morphological variations of *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* v.23, n.1, p.138–142, 1986a.
- MOROZUMI, T.; NICOLET, J. Some properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *J. Clin. Microbiol.* v.23, n.6, p.1022-1025, 1986b.
- MUNCH, S.; GRUND, S.; KRUGER, M. et al. Fimbriae and membranes of *Haemophilus parasuis*. *J. Vet. Med. B*, v.39, n.1, p. 59–64, 1992.
- NEDBALCOVA, K.; SATRAN, P.; JAGLIC, Z. et al. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. *Vet. Med.* v.51, n.5, p.168-179, 2006.
- NICOLET, J. *Haemophilus parasuis*. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L. et al. 7TH Edition. **Disease of Swine**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1992. p.526-528.
- NIELSEN, R. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. *Acta Vet. Scand.*, v.34, n.2, p. 193-198, 1993.
- OLIVEIRA, S. R. *Detecção de Haemophilus parasuis por meio da técnica de*

- imunoperoxidase em suínos experimentalmente infectados*. 1998. 66f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, S.; GALINA, L.; PIJOAN, C. et al. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.13, n.6, p. 495-501, 2001.
- OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. *J. Swine Health Prod.* V.10, n.5, p.221-225, 2002.
- OLIVEIRA, S.; BLACKALL, P. J.; PIJOAN, C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by serotyping and genotyping. *Am. J. Vet. Res.* v.64, n.4, p.435-442, 2003.
- OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Review article. *Vet. Microbiol.* v.99, n.1, p.1-12, 2004a.
- OLIVEIRA, S., PIJOAN, C. Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints. *Can. J. Vet. Res.* v.68, n.1, p.71-75, 2004b.
- OLIVEIRA, S.; OLESON, T.; TITUS, M. D. et al. Comparison of *Haemophilus parasuis* genotyping using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and ERIC-PCR. In: AMERICAN ASSOCIATION SWINE VETERINARY CONGRESS. 2004. *Proceedings...* Moines: Iowa, 2004, p. 273-276.
- OLIVEIRA, S. *Haemophilus parasuis* diagnostics. *J. Swine Health Prod.*, v.15, n.2, p. 99-103, 2007.
- OLVERA, A.; CERDA-CUELLAR, M.; ARAGON, V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. *Microbiol.*, v. 152, n.12, p. 3683-3690, 2006.
- OLVERA, A.; SEGALÉS, J.; ARAGÓN, V. et al. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods. *Vet. J.*, v.174, n.3, p. 522-529, 2007.
- PEET, R. L.; FRY, J., LLOYD, J.; HENDERSON, J. et al. *Haemophilus parasuis* septicemia in pigs. *Aust. Vet. J.*, v. 60, n.6, p. 187, 1983.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby , 1999. 648p.
- RAFIEE, M.; BARA, M.; STEPHENS, C. P. et al. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* v.78, n.12, p.846-849, 2000.
- RAFIEE, M., BLACKAL, P.J., Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* v.78,n.3, p.172-174, 2000.
- RAPP-GABRIELSON, V. J.; GABRIELSON, D. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am. J. Vet. Res.* v.53, n.5, p.659-664, 1992.
- RAPP-GABRIELSON, V. J.; KUCUR, G. J.; CLARK, J. Y. et al. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination. *Vet. Med.*, v.92, n.1, p. 83-90, 1997.
- RAPP-GABRIELSON, V. J. *Haemophilus parasuis*. In: Straw B. E., D’Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D.J. 8TH Edition. **Diseases of Swine**. Ames, IA: Iowa State Press, 1999. p.475-481.

- RAPP-GABRIELSON, V. J.; OLIVEIRA, S. R.; PIJOAN, C. et al. *Haemophilus parasuis*. In: Straw B. E., D'Allaire S., Mengeling W. L. et al.. 9th Edition. **Diseases of Swine**. Ames, IA: Iowa State Press, 2006. p.681-690.
- RIISING, H. J. Prevention of Glässer's disease through immunity to *H. parasuis*. *J. Vet. Med. B.*, v.28, n.8, p. 630-638, 1981.
- RUBIES, X.; KIELSTEIN, P.; COSTS, L.I. et al. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet. Microbiol.* v.66, n.3, p.245-248, 1999.
- RUIZ, A.; OLIVEIRA, S.; TORREMORALL, M. et al. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. *J. Clin. Microbiol.* v.39, n.5, p.1757-1762, 2001.
- SANTOS, J. L. *Epidemiologia e controle da infecção por Haemophilus parasuis*. 1997. 69f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- SANTOS, J. L., SOBESTIANSKY, J. Doença de Glässer. In: SOBESTIANSKY, J.; WEIBLEN, R.; MORÉS, N. et al. *Doença dos suínos*. 3^o ed. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. P. 89-93.
- SEGALES, J.; DOMINGO, M.; SOLANO, G. I. et al. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.9, n.3, p. 237-243, 1997.
- SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeat DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucl. Ac. Res.*, v.18, n.22, p. 6503-6508, 1990.
- SILVA, A. F.; COSTA, A. T. R.; FERREIRA, H. B. et al. Sensibilidade comparativa *in vitro* de amostras de *Pasteurella multocida* tipos A e D, *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* isoladas de casos clínicos de campo no período de 2003 a 2005. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., 2005, Fortaleza. *Anais....* Fortaleza – CE, 2005, p. 30-31.
- SMART, N.L.; MINIATS, O. P.; MACINNES, J. I. et al. 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. et al. An investigation of enzootic Glässer's disease in a specific pathogen-free grower-finisher facility using endonuclease analysis. *Can. Vet. J.*, v.34, n.3, p. 487-490, 1993.
- SOLANO-AGUILAR, G. I.; PIJOAN, C.; RAPP-GABRIELSON, V. et al. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. *Am. J. Vet. Res.* v.60, n.1, p. 81-87, 1999.
- TADJINE, M.; MITTAL, K. R.; BOURDON, S. Development of a serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *J. Clin. Microbiol.*, v.24, n. 2, p. 839-840, 2004.
- TAKAHASHI, K.; NAGAI, S.; YAGIHASHI, T. et al. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterin, and evaluation of bivalent vaccine

under laboratory and field conditions. *J. Vet. Med. Sci.*, v.63, n.5, p. 487-491, 2001.

VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. et al. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.7, n.4, p. 476-480, 1995.

VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. et al. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and traqueal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Can. J. Vet. Res.*, v.61, n.3, p. 200-206, 1997.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acid. Res.* v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.

ZUCKER, B. A.; BAGHIAN, A.; TRAU, R. et al. Detection of strain-specific antigenic epitopes on the lipooligosaccharide of *Haemophilus parasuis* by use of monoclonal and polyclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, n.1, p. 63-67, 1996.