

# INFEZIONE CONTEMPORANEA DA SIEROTIPI 4 E 12 DI *HAEMOPHILUS PARASUIS* IN UN ALLEVAMENTO SUINO

## SIMULTANEOUS INFECTION BY SEROTYPES 4 AND 12 OF *HAEMOPHILUS PARASUIS* IN A SWINE HERD

IODICE G.<sup>3</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, FRANCHI L.<sup>2</sup>, BONILAURI P<sup>1</sup>., MERENDA M.<sup>1</sup>, DOTTORI M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;

<sup>2</sup> Medico Veterinario, Gruppo Progeo Mangimi;

<sup>3</sup> Medico Veterinario, Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Parma.

**PAROLE CHIAVE:** *Haemophilus parasuis*, immunodiffusione in agar gel, sierotipo 12

**KEY WORDS:** *Haemophilus parasuis*, agar gel immunodiffusion, serovar 12

### RIASSUNTO

Nel periodo Marzo-Aprile 2009, in un allevamento suino ubicato nel nord Italia, è stato osservato un aumento delle perdite totali (morti e scarti) nella fase di post-svezzamento. L'anamnesi segnalava sintomatologia respiratoria associata a zoppie, sintomi nervosi e stati febbrili raggiungendo elevati indici di morbilità e mortalità. In seguito ad esami batteriologici eseguiti presso la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), sono stati isolati due sierotipi di *Haemophilus parasuis* tipizzati tramite immunodiffusione in agar gel ed emoagglutinazione indiretta. In particolare, due ceppi appartenenti al sierotipo 4 sono stati isolati da suini presentanti la forma sistemica (polisierosite), mentre un terzo ceppo, isolato da un suino con quadri di broncopolmonite catarrale è risultato appartenere al sierotipo 12. Questi risultati sono in accordo con la classificazione riportata da Kielstein e Rapp-Gabrielson del 1992, nella quale il sierotipo 12 viene descritto come altamente virulento ed in grado di provocare la morte in suini SPF 4 giorni dopo l'infezione, in assenza di quadri di polisierosite. Al contrario il sierotipo 4, sempre nella stessa classificazione viene inquadrato come a moderata virulenza ed in grado di provocare quadri di polisierosite, con mortalità bassa o assente. Tuttavia, la relazione tra sierotipi isolati e lesioni anatomopatologiche osservate in campo può essere soggetta ad elevata variabilità ed essere influenzata da diversi fattori (fattori legati all'ospite, vaccinazioni, coinfezioni batteriche e virali). Nel caso clinico descritto *H.parasuis* è stato riscontrato in associazione con altri patogeni come *Actinobacillus pleuropneumoniae* e PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus). I risultati di questo lavoro sottolineano l'importanza di una corretta sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* isolati, soprattutto nell'ottica di approntare idonee misure terapeutiche e soprattutto di profilassi vaccinale.

### ABSTRACT

In a pig-farm of northern Italy, during March-April 2009, was observed an increasing losses in the post-weaning period. The piglets showed respiratory symptoms coupled with lameness, nervous signs and pyrexia (41°C). Two serovars of *Haemophilus parasuis* were isolated from diseased pigs in connection with routine diagnostics of Istituto Zooprofilattico di Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER), Reggio Emilia Laboratory. The strains isolated were serotyped using the agar gel immunodiffusion test and indirect haemoagglutination. Two strains isolated from pigs with systemic disease (polysierositis) belonged to serovar 4, while another strain isolated from pig with bronchopneumonia was serotyped as serovar 12. This results agreed with the classification of Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), in which the

serovar 12 has been shown to be highly virulent causing death in SPF pigs within 4 days after infection without polysierositis. In contrast, in the same classification, serovar 4 would be moderately virulent causing polysierositis and generally not death. However, the connection between serovar isolated and gross lesions observed can be influenced by several factors (host factors, vaccinations and other bacterial and viral diseases). In this work *H. parasuis* coexisted with other pathogens like *Actinobacillus pleuropneumoniae* and PRRSV. The results of this work showed the importance of isolates serotyping, mainly if the vaccination is to be used for disease protection.

## INTRODUZIONE

*Haemophilus parasuis* è ritenuto l'agente eziologico della malattia di Glässer la quale è caratterizzata da polisierositi e poliartriti sierofibrinose o fibrinopurulente. Batterio cosmopolita, si presenta come un coccobacillo Gram-, anaerobio facoltativo, immobile, non emolitico e dotato di spiccato polimorfismo.

Negli ultimi anni le tecniche di allevamento intensivo adottate, con conseguente aumento degli "stressors" e il concomitante sviluppo di patogeni "door opener" come il PRRSV, hanno fatto sì che *H. parasuis* si ripresentasse come problema attuale ed in grado di provocare gravi danni anche in allevamenti suini con elevati standard sanitari.

A tutt'oggi sono conosciuti 15 sierotipi di *H. parasuis* che presentano prevalenze diverse a seconda delle aree geografiche considerate. Tuttavia, analizzando studi di sierotipizzazione dei ceppi isolati eseguiti in diversi paesi Europei, si può osservare come i sierotipi 4, 5 e 13 risultino essere i più prevalenti, mentre altri sierotipi come l'1, il 2, il 12, il 14 e il 15 mostrino prevalenze relativamente basse o addirittura trascurabili (Ange et al., 2004).

I 15 sierotipi di *H. parasuis* sono stati classificati in 4 gruppi sulla base del grado di virulenza in suini SPF (Kielstein P. and Rapp-Gabrielson V.J., 1992). Nel primo gruppo sono stati classificati i sierotipi 1, 5, 10, 12, 13 e 14 i quali provocano forme cliniche acute caratterizzate da alta morbilità e morte entro 96 ore. Nel secondo gruppo ritroviamo i sierotipi 2, 4 e 15 che provocano, invece, la cosiddetta forma sistemica, caratterizzata da polisierosite, con una mortalità bassa o assente. Nel terzo gruppo è presente il solo sierotipo 8 il quale si limita a provocare lievi sintomi e lesioni. Infine, al quarto, appartengono i sierotipi 3, 6, 7, 9 e 11 considerati commensali delle prime vie respiratorie, che non provocano quindi né sintomatologia clinica né lesioni.

In condizioni di campo, tuttavia, i quadri clinici ed anatomopatologici provocati da un determinato sierotipo possono subire importanti variazioni. Questo si verifica perché *H. parasuis* può sovrapporsi ad infezioni virali come germe d'irruzione secondaria ovvero essere concomitante ad altre infezioni batteriche o ancora essere presente in un focolaio di malattia con più sierotipi. Considerando la diversità antigenica riconosciuta tra i vari sierotipi e l'elevata presenza di ceppi classificati come non tipizzabili si sottolinea l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H. parasuis* sia per studi di prevalenza, sia per la scelta di appropriate misure di controllo della malattia. In questo contesto, soprattutto quando quest'ultimo obiettivo vuole essere raggiunto con l'impiego della vaccinazione è necessario poter confrontare l'omologia tra i ceppi presenti nelle preparazioni vaccinali e quelli circolanti in allevamento. Quest'ultimo concetto è particolarmente importante nel valutare i possibili benefici ottenuti con la vaccinazione nei confronti di *H. parasuis*, considerando che la cross-protezione, seppur con un certo grado di variabilità, è stata dimostrata tra differenti sierotipi (Oliveira and Pijoan, 2004).

Nel presente lavoro si vogliono descrivere gli aspetti clinici ed anatomopatologici e l'iter diagnostico di un caso clinico provocato da sierotipi multipli di *H. parasuis* in un allevamento suino.

## **MATERIALI E METODI**

### **Allevamento**

L'allevamento oggetto del lavoro era un ciclo aperto di circa 500 scrofe con rimonta interna, organizzato in banda bisettimanale ed ubicato in un unico sito in provincia di Modena. Lo svezzamento a 28 giorni portava alla produzione di lotti di 200 suinetti che venivano allevati in salette dedicate e successivamente venduti a 110-120 giorni di vita per essere destinati all'ingrasso.

Il protocollo vaccinale adottato nell'allevamento prevedeva la vaccinazione per PCV-2 (*Porcine Circovirus type II*) e *Mycoplasma hyopneumoniae* attraverso la somministrazione di una singola dose vaccinale a 3 e a 5 settimane d'età rispettivamente. Nella scrofaia il piano vaccinale prevedeva interventi per rinite atrofica, mal rosso, parvoviroosi, malattia di Aujeszky e PRRS (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*).

### **Sierologia ed indagini virologiche per PRRSV e PCV2**

Nel periodo considerato sono state condotte sul siero di sangue di 6 animali di 8 settimane d'età, con sintomatologia clinica che descriveremo in seguito, indagini sierologiche per la ricerca di anticorpi anti-PRRSV (ELISA indiretta kit IDEXX) ed anti-PCV2 (ELISA competitiva kit IZS-BS), nonché la ricerca del virus della PRRS tramite rt-PCR impiegando la metodica descritta de Bonilauri et al. (2003) e la PCR quantitativa per PCV2 seguendo il metodo indicato da Olvera et al. (2004).

### **Esame necroscopico**

Presso la sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) sono stati conferiti 7 suinetti deceduti in seguito a sintomatologia prevalentemente respiratoria. L'invio del materiale patologico è avvenuto in due distinti conferimenti, a distanza di una settimana l'uno dall'altro e della consistenza di 3 e 4 suinetti rispettivamente.

L'esame anatomopatologico è stato eseguito secondo procedure standardizzate.

### **Esame batteriologico**

Sulla base dei rilievi anatomopatologici eseguiti sui suinetti sopraccitati, sono state condotte le indagini di laboratorio ritenute più opportune, seguendo i protocolli standardizzati presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione di Reggio Emilia. In particolare, in presenza di quadri macroscopici compatibili con una diagnosi di Malattia di Glässer, è stato applicato il protocollo diagnostico di seguito descritto. Il materiale patologico costituito da polmoni, tamponi bronchiali, tamponi di liquido pericardico e di liquido cefalorachidiano e prelievi di liquido sinoviale, sono stati utilizzati per la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con Nicotinammide adenina dinucleotide-NAD. Quest'ultimo è stato utilizzato per permettere la crescita di quei patogeni che, come l'*Haemophilus parasuis* sono per l'appunto NAD-dipendenti. L'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore, in aerobiosi per le piastre di agar siero e di agar Gassner ed in termostato a CO<sub>2</sub> per l'agar sangue addizionato con NAD. Al termine dell'incubazione la crescita di *H. parasuis* è stata confermata tramite test biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti ed ureasi negative) e morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica al microscopio ottico dopo colorazione di Gram).

Le eventuali colonie batteriche cresciute sui terreni colturali ed assimilabili per morfologia ad altri agenti patogeni (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* ecc.) sono state fenotipizzate impiegando metodi biochimici e microbiologici in uso presso la Sezione di Reggio Emilia.

### **Indagini biomolecolari per *H.parasuis***

Nei casi caratterizzati da lesioni anatomopatologiche compatibili con malattia di Glässer, oltre all'esame batteriologico, il protocollo diagnostico ha previsto il prelievo preventivo di campioni di polmone e pericardio che sono stati successivamente congelati e conservati a -20°C. Questo materiale è stato utilizzato nella ricerca di *H.parasuis* tramite PCR in quei casi in cui l'isolamento non ha avuto successo. La PCR sopraccitata è stata eseguita tramite la metodica descritta da Olivera et al. nel 2001, impiegando i primer HPS1\_F 5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3' e HPS2\_R 5'-GGCTTCGTCACCCTCTGT-3'.

### **Sierotipizzazione di *H.parasuis***

Il protocollo di sierotipizzazione ha previsto l'impiego di antisieri policlonali di coniglio prodotti nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13, scelti ed acquistati presso il Gallant Custom Laboratory (Canada) sulla base di dati di prevalenza raccolti e pubblicati in lavori scientifici eseguiti in diversi paesi a livello mondiale (Blackall et al., 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliviera et al., 2003; Angen et al., 2004; Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Cai et al., 2005.).

Le prove di sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* isolati sono state eseguite tramite immunodiffusione in gel di agar (AGID). La procedura impiegata ha previsto le fasi riportate di seguito (Rafiee M. and Blackall P.J. 2000):

- Il ceppo di *H.parasuis* da sierotipizzare è stato seminato su 2 piastre di agar sangue addizionate con NAD ed incubato in termostato a CO<sub>2</sub> a 37°C per 48 ore. Successivamente, valutata la crescita in purezza del batterio, ogni piastra è stata lavata con 1,5 ml di PBS, eseguendo inoltre una delicata spatolatura.

- la soluzione ottenuta è stata sottoposta a trattamento termico in autoclave ad una temperatura di 120°C per 90 minuti, necessario per l'eliminazione degli antigeni termolabili.

- dopo il trattamento termico la soluzione è stata centrifugata a 2000 giri per 10 minuti per sedimentare le particelle più grossolane sul fondo della provetta e procedere successivamente al prelievo del surnatante contenente l'antigene da impiegare nella sierotipizzazione.

La sierotipizzazione è stata quindi eseguita utilizzando piastre di agar gel in cui sono state praticate una serie di quattro "rosette" di fori, ognuna composta da un foro centrale e sei fori periferici, idonei ad ospitare rispettivamente 35 µl di siero positivo di referenza e 6 antigeni di cui 5 in esame ed uno di referenza (controllo positivo), omologo al siero positivo impiegato.

Le piastre sopraccitate sono state incubate a temperatura ambiente e la lettura è stata eseguita a 36, 48, 72 ore andando a valutare l'eventuale formazione di una banda di precipitazione tra il pozzetto contenente l'antigene in esame e l'antisiero noto corrispondente.

I ceppi isolati sono stati inoltre sierotipizzati presso l'Innovative Veterinary Diagnostic Laboratory (IVD GmbH) di Hannover, impiegando una metodica di emoagglutinazione indiretta come descritto da Turni e Blackall nel 2005.

## **RISULTATI**

### **Rilievi clinici**

Come accennato brevemente in precedenza, nell'allevamento in esame si era verificato un aumento delle perdite totali nella fase di post-svezzamento che, tra decessi e scarti, raggiungevano circa il 9-10%. Il quadro clinico era caratterizzato prevalentemente da sintomi respiratori, presenti nel 20% circa degli animali tra 7 e 12 settimane d'età. In diversi animali, inoltre, si osservava zoppia con quadri riconducibili ad artrite tarsica e carpica. Era presente inoltre sintomatologia nervosa e febbre fino a 41°C.

### Sierologia ed indagini virologiche per PRRSV e PCV2

I risultati delle indagini sierologiche e virologiche per PRRSV e PCV2 sono riassunti in tabella 1.

Tabella 1: Risultati delle indagini sierologiche e biomolecolari per PRRSV e PCV2 eseguite sul siero di sangue di sei suini con sintomatologia clinica, durante il focolaio oggetto del lavoro.

Tabella 1: PRRSV and PCV2 serological and PCR results on six diseased pig sera, belonging to the herd described in this study.

Campione	PRRS Elisa Ab S/P	PCV2 ELISA Ab	Rt-PCR PRRSV	Real time PCR PCV2
1	1,0	1/100	1 pool positivo ceppo Europeo	Negativa
2	1,8	1/100		Negativa
3	1,9	1/100		Negativa
4	2,1	1/100	Negativa	Negativa
5	2,4	1/100		Negativa
6	2,5	1/100		Negativa

### Esame necroscopico

L'esame anatomopatologico eseguito sui 3 suinetti del primo conferimento ha mostrato quadri di pleurite e pericardite fibrinosa associati ad artrite fibrinosa localizzata al tarso e al carpo dei quattro arti nel primo animale, di broncopolmonite catarrale purulenta ai lobi apicali in forma bilaterale nel secondo e pericardite fibrinosa con pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica associata a quadri di polmonite interstiziale nel terzo.

Sulle 4 carcasse facenti parte del secondo conferimento, invece, si sono evidenziati rispettivamente quadri macroscopici di broncopolmonite catarrale localizzata ai lobi apicali nel primo, di pleurite, pericardite, perisplenite e periepatite di tipo fibrinoso nel secondo e di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica associata a quadri di pericardite, perisplenite e periepatite fibrinosa nel terzo. Nel quarto animale conferito erano assenti lesioni anatomopatologiche all'apparato respiratorio, così come a livello degli altri apparati.

Ad eccezione delle lesioni descritte, in entrambe i conferimenti non si evidenziavano altri quadri patologici macroscopici a livello di altri apparati o organi.

### Esame batteriologico

L'esame batteriologico eseguito sul materiale patologico prelevato dai suini del primo conferimento ha permesso l'isolamento di un ceppo di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, tipizzato come biotipo 2 sierotipo 7, mentre pur in presenza di lesioni riferibili ad infezione da *H.parasuis*, non è stato possibile l'isolamento del patogeno. Nel secondo conferimento, tuttavia, l'isolamento di *H.parasuis* è stato ottenuto da 3 suini su 4, in due casi in presenza di lesioni riferibili a malattia di Glässer e in un caso, da lesioni esclusivamente caratterizzate da broncopolmonite catarrale (tabella 2). Nel secondo conferimento, inoltre, è stato isolato un ceppo di *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 sierotipo 9.

I risultati delle indagini batteriologiche, per i due conferimenti sopraccitati, sono riassunti in tabella 2.

### Indagini biomolecolari per *H.parasuis*

In seguito all'insuccesso nell'isolamento di *H.parasuis* da lesioni anatomopatologiche

caratteristiche di polisierosite osservate nei suinetti facenti parte del primo conferimento, si è proceduto alla ricerca dell'agente eziologico sopraccitato tramite PCR da campioni di polmone e pericardio, prelevati come da protocollo diagnostico precedentemente descritto. Attraverso questo metodo analitico è stata dimostrata la presenza dell'agente eziologico nei campioni 1 e 3 descritti in tabella 2.

### Sierotipizzazione di *H. parasuis*

I ceppi di *H. parasuis* isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione con le modalità descritte in precedenza. L'applicazione di questa metodica ha permesso di classificare i ceppi isolati come sierotipo 4, isolato da due suini presentati la forma sistemica (polisierosite fibrinosa) e sierotipo 12, isolato da polmoni di suino presentanti esclusivamente quadri di broncopolmonite catarrale.

I risultati della sierotipizzazione tramite immunodiffusione in agar gel sono stati confermati tramite il test di emoagglutinazione indiretta.

Tabella 2: Lesioni anatomico-patologiche e risultati dell'esame batteriologico eseguito sui sette suini conferiti presso IZSLER, sezione di Reggio Emilia.

Table 2: Gross lesions and bacteriological results on seven tested pigs sent to the IZSLER, Reggio Emilia laboratory.

Campione	Lesioni anatomopatologiche	Esame batteriologico
1	Pleurite, pericardite e artrite fibrinosa	Negativo
2	Broncopolmonite catarral-purulenta	Negativo
3	Pericardite fibrinosa, pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica, polmonite interstiziale	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biotipo 2 sierotipo 7
4	Broncopolmonite catarrale	<i>Haemophilus parasuis</i> sierotipo 12
5	Pleurite ,pericardite, periepatite e perisplenite fibrinosa	<i>Haemophilus parasuis</i> sierotipo 4
6	Pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica, pericardite, perisplenite e periepatite fibrinosa	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biotipo 1 sierotipo 9 <i>Haemophilus parasuis</i> sierotipo 4
7	Assenti	Negativo

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Analizzando i risultati ottenuti nel presente lavoro sono diversi gli argomenti che necessitano di essere sottoposti a discussione.

In primo luogo occorre sottolineare le difficoltà che si riscontrano nell'isolamento di *H. parasuis* anche da lesioni anatomopatologiche ritenute patognomoniche. Sulla base

dell'esperienza maturata è possibile affermare che le probabilità di isolare con successo il patogeno sono fortemente influenzate dallo stato di conservazione dei campioni patologici. Pertanto più ci si allontana, in termini temporali, dal momento della morte dell'animale più si abbassano le probabilità di isolamento di *H.parasuis*. Inoltre, evenienze comuni come gli stress termici subiti dai campioni ed i trattamenti antibiotici effettuati sugli animali aumentano le probabilità di insuccesso dell'esame batteriologico.

L'applicazione di un iter diagnostico che preveda il prelievo preventivo di materiale patologico da destinare alla ricerca di *H.parasuis* tramite PCR, nei casi di mancato isolamento del patogeno, può ovviare in parte all'insuccesso dell'esame batteriologico. Tuttavia, come descritto precedentemente, l'isolamento di *H.parasuis* rimane una condizione indispensabile per la successiva sierotipizzazione. Questa assume un ruolo tutt'altro che marginale, considerando l'importanza che la conoscenza del sierotipo circolante in un determinato allevamento ha nella scelta di appropriate misure terapeutiche e di profilassi vaccinale. Quest'ultimo concetto è particolarmente importante nella valutazione dei possibili benefici ottenuti con la vaccinazione nei confronti di *H.parasuis*. In questo contesto, infatti, occorre considerare l'omologia tra i sierotipi presenti nei vaccini e quelli circolanti in allevamento ed inoltre che la cross-protezione, seppur con un certo grado di variabilità, è stata dimostrata tra ceppi appartenenti a sierotipi diversi (Bak and Riising, 2002; Oliveira and Pijoan, 2004).

Un altro aspetto che merita di essere sottolineato riguarda la contemporanea presenza di due diversi sierotipi di *H.parasuis* nell'ambito del medesimo focolaio di malattia. In particolare la presenza del sierotipo 12 suscita ulteriore interesse in quanto relativamente meno frequente rispetto ad altri sierotipi come il 4, il 5 ed il 13 che diversi autori descrivono come prevalenti in numerosi paesi (Blackall et al., 1996; Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Oliveira et al., 2003; Angen et al., 2004; Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Cai et al., 2005.). Il sierotipo 12, al contrario, viene descritto con prevalenze del 7% e 8% in Stati Uniti e Canada rispettivamente (Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; Tadjine et al., 2004) e del 3% in Australia, Germania, Spagna e Danimarca (Blackall et al. 1996, Rùbies et al., 1999; Kielstein and Wuthe, 1998; Angen et al., 2004;).

Si sottolinea inoltre come i due ceppi di *H.parasuis* appartenenti al sierotipo 4 siano stati isolati da suini presentanti la forma sistemica della malattia (polisierosite) mentre il sierotipo 12 da un suino con lesioni confinate esclusivamente all'apparato respiratorio e caratterizzate da broncopolmonite catarrale. Questo appare in accordo con quanto riportato da Kielstein P. e Rapp-Gabrielson V.J. nel 1992, nello schema di classificazione dei sierotipi sulla base del grado di virulenza in suini SPF, già descritto nell'introduzione del lavoro.

Infine appare importante sottolineare la presenza, in un contesto di malattia sostenuta da *H.parasuis*, di altri agenti patogeni di estrema importanza come il virus della PRRS e l'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

In conclusione, nel presente lavoro è evidente l'importanza della sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis*, la quale fornisce informazioni precise da utilizzare nella scelta di appropriate misure di controllo della malattia. Questo dato, sommato alla eventuale presenza di altri patogeni batterici e virali dev'essere considerato nel valutare i risultati attesi con la vaccinazione, soprattutto quando questa viene scelta come metodo principale di controllo della malattia.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia il Dr. Maurizio Cesabianchi, National Veterinary Manager Swine, Pfizer, per la collaborazione nell'attività di sierotipizzazione dei ceppi di *H.parasuis*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004). Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 103, 255-258.
2. Bak H., Riising H.J. (2002). Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet. Rec.* 151, 502-505.
3. Blackall P.J., Rapp-Gabrielson V.J., Hampson D.J. (1996). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. *Aust. Vet. J.* 73:93-95.
4. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Meriardi G., Dottori M. (2003). Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases- Roma June 29th July 2nd, 2003, pp.98-99.
5. Cai X., Chen H., Blackall P.J., Yin Z., Wang L., Liu Z., Jin M. (2005). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Veterinary Microbiology* 111, 231-236.
6. Kielstein P., Rapp-Gabrielson V.J. (1992). Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. clin. microbiol.* 30, 826-865.
7. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. (2001). Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn. Invest.* 2001 Nov;13:495-501.
8. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary microbiology* 99, 1-12.
9. Oliveira S., Blackall P. J., Pijoan C. (2003). Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. *Am. J. Vet. Res.* 64:435-442.
10. Rafiee M., Blackall P.J. (2000). Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J* 78, 172-174.
11. Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am. J. Vet. Res.* 53:659-664.
12. Rùbies X., Kielstein P., Costa L., Riera P., Artigas C, Espuna E. (1999). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet. Microbiol.* 66, 245-248.
13. Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottscalk M. (2004). Development of a New Serological Test for Serotyping *Haemophilus parasuis* Isolates and Determination of Their Prevalence in North America. *Journal of Clinical Microbiology* 422, 839-840.
14. Turni C., Blackall P.J. (2005). Comparison of the indirect haemoagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology* 106, 145-151.