

SIEROTIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *HAEMOPHILUS PARASUIS* ISOLATI DA CAMPIONI PATOLOGICI

SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF HAEMOPHILUS PARASUIS STRAINS ISOLATED FROM PATHOLOGICAL SAMPLES

LUPPI A.¹, BONILAURI P.¹, FERRARI E.², GHERPELLI Y.¹, MERALDI G.¹, DOTTORI M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER); ²ASL di Modena, Distretto di Carpi

PAROLE CHIAVE: *Haemophilus parasuis*, sierotipizzazione, immunodiffusione in agar gel
KEY WORDS: *Haemophilus parasuis*, serotyping, gel diffusion (GD)

RIASSUNTO. Quarantaquattro ceppi di *Haemophilus parasuis* sono stati isolati nel periodo 2007-2009 da tessuti patologici di suino durante l'attività diagnostica di routine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Sezione di Reggio Emilia. I ceppi sopraccitati sono stati sottoposti a sierotipizzazione impiegando gli antisieri nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13. La scelta e l'acquisto degli antisieri si è basata su dati di prevalenza riportati da diversi autori in altri paesi europei. Il sierotipo 4 è risultato il più prevalente (34%) seguito dal sierotipo 13 (22,7%) e dal sierotipo 5 (15,9%). I ceppi non tipizzabili sono risultati essere il 22,7%. I ceppi isolati sono stati suddivisi in due gruppi a seconda che l'isolamento sia stato effettuato da casi di malattia sistemica (polisierosite fibrinosa, artrite e meningite) o semplicemente dalle vie respiratorie profonde. Il dato principale che si evince da questa valutazione è una maggior prevalenza del sierotipo 4 in forme sistemiche piuttosto che in casi di coinvolgimento esclusivo delle vie respiratorie (brucopolmonite). L'isolamento dei sierotipi 5 e 13 da suini con presenza o assenza di quadri di polisierosite fibrinosa è sovrapponibile, mentre i ceppi non tipizzabili sono risultati essere più frequentemente associati alle forme cosiddette non sistemiche.

ABSTRACT. From 2007-2009 a total of 44 *Haemophilus parasuis* field isolates was collected from diseased pigs in connection with routine diagnostics of Istituto Zooprofilattico of Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER), Reggio Emilia Laboratory. The isolates were serotyped by agar gel immunodiffusion test using specific antisera against serovars 2, 4, 5, 12, 13. The choice of antisera used was performed considering the prevalence of different virulent serotypes described in other european countries. In our study serovar 4 was the most prevalent (34%) followed by serovar 13 (22,7%) and serovar 5 (15,9%), while 22,7% of the isolates could not be assigned to a serovar (nontypable isolates). The strains could be divided into two groups depending on whether they were isolated from cases with systemic disease (polyserositis, arthritis or meningitis) or if they only were found in the lower respiratory tract. The most marked difference were observed for serovar 4, which had a higher prevalence in systemic infection compared to respiratory disease. The frequency of the isolation of serotypes 5 and 13 from pigs with or without polysierositis were similar, while nontypable isolates had a higher prevalence in respiratory disease compared to systemic infection.

INTRODUZIONE

Haemophilus parasuis è un batterio pleomorfo, nicotinammide adenina dinucleotide (NAD)-dipendente, Gram negativo, considerato l'agente eziologico responsabile della malattia di

Glässer, caratterizzata da polisierosite fibrinosa, poliartrite e meningite. Oltre alla forma che potremmo definire classica, si possono incontrare casi di malattia acuta setticemica in cui si osservano esclusivamente quadri di broncopolmonite in assenza di polisierosite. In alcuni casi, infine, possono essere isolati ceppi di *H.parasuis* commensali delle prime vie dell'apparato respiratorio in assenza di malattia (Angen et al., 2004). La malattia di Glässer è stata considerata storicamente una patologia sporadica e stress-associata, tuttavia, in alcuni allevamenti assume i connotati di malattia contagiosa ad elevata morbilità e mortalità con importanti perdite economiche. *H.parasuis* presenta una marcata eterogeneità antigenica, in relazione alla quale è stato classificato in 15 sierotipi a cui sono stati associati diversi gradi di virulenza (tabella 1).

Tabella 1: Valutazione della virulenza dei diversi sierotipi di *H.parasuis* in seguito ad inoculazione intraperitoneale in suini SPF (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).

Table 1: Serotypes virulence evaluation in SPF pigs intraperitoneally inoculated (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992).

Sierotipi	Virulenza
1,5,10,12,13,14	<u>Alta</u> : malattia grave con elevata mortalità entro 4 giorni dall'infezione
2,4,15	<u>Moderata</u> : polisierosite con mortalità bassa o assente
8	<u>Bassa</u> : lievi sintomi e lesioni
3,6,7,9,11	<u>Assente</u> : assenza di sintomatologia clinica e lesioni.

La prevalenza dei diversi sierotipi varia a seconda dell'area geografica considerata, come riportato in numerosi lavori scientifici (tabella 2), tuttavia i dati relativi alla realtà italiana sono assolutamente carenti.

Tabella 2: Prevalenza dei sierotipi di *Haemophilus parasuis* isolati in diverse aree geografiche (^aBlackall et al., 1996; ^bRapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; ^cOliveira et al., 2003; ^dAngen et al., 2004; ^eRùbies et al., 1999; ^fKielstein and Wuthe, 1998; ^gCai et al., 2005.).

Table 2: *Haemophilus parasuis* serovars prevalence and geographical origin (^aBlackall et al., 1996; ^bRapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992; ^cOliveira et al., 2003; ^dAngen et al., 2004; ^eRùbies et al., 1999; ^fKielstein and Wuthe, 1998; ^gCai et al., 2005.).

Area geografica	Sierotipo (%)
Australia ^a	5 (23%), 13 (19%), 4 (13%), 9 (6%); 1,(3%), 2 (3%), 12 (3%), NT* (29%)
Canada ^b	5 (24%), 4 (16%), 13 (11%), 14 (9%), 2 (8%), 12 (7%), NT*(15%)
Stati Uniti ^c	4 (39%), 3 (8%), 12 (7%), 1 (7%), 2 (4%), 14 (3%), NT* (27%)
Danimarca ^d	5 (36%), 13 (22%), 4 (13%), , NT* (15%)
Spagna ^e	5 (18%), 4 (16%), 2 (9%), 13 (8%), 7 (4%), NT* (29%)
Germania ^f	5 (24%), 4 (17%), 2 (5%), 13 (4%), 12 (3%), 7 (2%), NT* (26%)
Cina ^g	4 (24%), 5 (19%), 13 (12%), 14 (7%), 12 (7%), NT* (12%)

* NT: non tipizzabili;

Il controllo della malattia può essere raggiunto sia attraverso la vaccinazione (Oliveira and Pijoan, 2004) sia con l'impiego di misure terapeutiche (Aarestrup et al., 2004). Il dato relativo alla prevalenza dei sierotipi di *H.parasuis* circolanti in una determinata area è di notevole importanza quando la vaccinazione viene scelta come metodo di controllo della malattia. A tal proposito, la variabilità antigenica tra ceppi diversi di *H.parasuis* è stata confermata da numerosi studi che hanno evidenziato come il grado di cross-protezione fra differenti sierotipi sia variabile (Bak and Riising, 2002). Per quanto riguarda l'impiego della terapia nel controllo della malattia esiste una certa variabilità nella risposta ai trattamenti antibiotici tra ceppi isolati in diversi paesi europei e questo, unitamente alla difficoltà di allestimento di prove di sensibilità in vitro (antibiogrammi, MIC ecc.), rende l'intervento terapeutico nei confronti di *H.parasuis* non privo di incognite (De la Fuente et al., 2007).

Nel presente lavoro si riporta l'attività di sierotipizzazione di ceppi di *H.parasuis* isolati durante l'attività diagnostica di routine svolta presso la Sezione di Reggio Emilia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) nel periodo 2007- 2009.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed indagini batteriologiche

Durante l'attività diagnostica di routine della Sezione di Reggio Emilia (IZSLER) nel periodo 2007-2009, il materiale patologico conferito per accertamenti diagnostici è stato sottoposto alle indagini di laboratorio ritenute più opportune sulla base dei quadri anatomopatologici osservati. In particolare, le indagini batteriologiche in presenza di lesioni macroscopiche riferibili a patologia respiratoria (polmonite, broncopolmonite, pleurite) con coinvolgimento o meno di altri distretti (artrite, meningite e pericardite), hanno previsto la semina del materiale patologico su tre terreni colturali come da protocollo standardizzato presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione. I terreni colturali impiegati sono stati: 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*, necessitano di V growth factor (nicotinammide adenina dinucleotide-NAD). L'agar siero e l'agar Gassner sono stati incubati in aerobiosi mentre l'agar sangue addizionato con NAD in termostato a CO₂ al 10%. In tutti i casi l'incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore. La presenza di *H.parasuis* è stata confermata tramite test biochimici (colonie non emolitiche NAD dipendenti ed ureasi negative), morfologici (crescita di colonie con morfologia tipica al microscopio ottico dopo colorazione di Gram) e biomolecolari tramite PCR (Olivera et al., 2001).

Le colonie batteriche per morfologia assimilabili ad *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida* sono state fenotipizzate impiegando metodi biochimici e microbiologici in uso presso la Sezione di Reggio Emilia.

Sierotipizzazione

I ceppi di *H.parasuis* isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione tramite immunodiffusione in gel di agar (AGID), seguendo la metodica descritta da Rafiee M. and Blackall P.J. nel 2000. Nel protocollo di sierotipizzazione sono stati impiegati gli

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 europei (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.). Oltre a questo parametro, nella scelta degli antisieri da utilizzare, è stato considerato il grado di virulenza dei singoli sierotipi (il pannello di antisieri a nostra disposizione permette la sierotipizzazione della maggioranza dei sierotipi a media e ad alta virulenza) e la possibilità di valutare l'eventuale omologia tra i sierotipi circolanti e quelli presenti nelle preparazioni vaccinali.

Il protocollo di sierotipizzazione ha previsto le seguenti fasi che vengono brevemente riportate di seguito. Il ceppo in esame cresciuto in purezza su due piastre di agar sangue addizionate con NAD è stato raccolto utilizzando come soluzione di lavaggio 1,5 ml di PBS per piastra. La sospensione batterica ottenuta è stata sottoposta a trattamento in autoclave per 90 minuti ad una temperatura di 120°C e a successiva centrifugazione a 2000 giri per 10 minuti. Il sovranatante (antigene) ottenuto è stato successivamente utilizzato per la sierotipizzazione.

La metodica di immunodiffusione è stata 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 riferimento e 35 µl di ognuno dei 6 antigeni, di cui 5 appartenenti a ceppi batterici in esame ed uno di riferimento omologo al siero positivo impiegato.

Le piastre sopraccitate, dopo l'allestimento della prova, sono state incubate a temperatura ambiente e la lettura è stata eseguita a 36, 48 e 72 ore, andando a valutare l'eventuale formazione di una banda di precipitazione tra i pozzetti contenenti gli antigeni batterici in esame e l'antisiero noto corrispondente.

Analisi statistica

Le differenze tra le frequenze dei sierotipi di *H. parasuis* isolati, rispetto alle lesioni anatomopatologiche riscontrate (polisierosite e broncopolmonite), sono state confrontate tramite test χ^2 con livello di significatività $p < 0.05$.

RISULTATI

I 44 ceppi di *H. parasuis* isolati nel periodo 2007-2009 da altrettante carcasse di suino, sono stati identificati come sierotipo 4 (34%), sierotipo 13 (22,7%), sierotipo 5 (15,9%), sierotipo 2 (2,2%) e sierotipo 12 (2,2%). I ceppi non tipizzabili sono risultati essere il 22,7% sul totale.

L'isolamento di *H. parasuis* è stato ottenuto in 23 casi da materiale patologico prelevato da suini presentanti le caratteristiche lesioni riferibili a malattia di Glässer (forma sistemica). Nei restanti casi (21/44), l'esame anatomopatologico ha evidenziato esclusivamente quadri di broncopolmonite catarrale. Relativamente alle lesioni riscontrate, nell'87% dei casi di polisierosite, i ceppi isolati appartenevano ai sierotipi 4 (48%), 13 (26%) e 5 (13%), mentre quelli non tipizzabili sono risultati essere soltanto il 9%. Nel 38% dei casi di broncopolmonite i ceppi isolati sono risultati non tipizzabili, mentre i ceppi dei sierotipi 4, 13 e 5 sono risultati egualmente rappresentati (tabella 3). Le differenze osservate tra frequenze dei diversi sierotipi e le lesioni riscontrate a livello anatomopatologico non sono risultate statisticamente significative (test χ^2).

Tabella 3: prevalenza dei sierotipi di *H.parasuis* sul totale dei ceppi isolati suddivisi in base alle lesioni rilevate in seguito ad esame anatomico-patologico.

Table 3: *H.parasuis* serotypes prevalence and gross lesions observed.

Sierotipo	% sul totale	Lesioni	
		Polisierosite fibrinosa	Broncopolmonite
4 (15 ceppi)	34%	11 (48%)	4 (19%)
13 (10 ceppi)	22,7%	6 (26%)	4 (19%)
5 (7 ceppi)	15,9%	3 (13%)	4 (19%)
12 (1 ceppo)	2,2%	0	1
2 (1 ceppo)	2,2%	1	0
Non tipizzabili (10 ceppi)	22,7%	2 (9%)	8 (38%)
TOTALE		23	21

I patogeni batterici isolati in concomitanza ad *H.parasuis* sono stati in ordine di frequenza: *P.multocida* 11/44, *S.suis* 5/44, *E.coli* 4/44, *A.pleuropneumoniae* 3/44 e *B.bronchiseptica* 2/44.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Negli ultimi anni *H.parasuis* si sta affermando tra le principali cause di mortalità nelle prime settimane di vita nei suinetti degli allevamenti italiani. I fattori che hanno determinato l'aumento dei focolai di malattia indotta da *H.parasuis* non sono conosciuti, tuttavia lo svezzamento precoce dei suinetti può avere un ruolo importante nell'epidemiologia della malattia, favorendo la precoce colonizzazione di ceppi virulenti del patogeno e la loro diffusione all'interno dell'allevamento (Oliveira et al., 2004).

Nel presente lavoro, la sierotipizzazione di *H.parasuis* ha previsto l'esclusivo impiego degli antisieri nei confronti dei sierotipi 2, 4, 5, 12, 13, scelti applicando i criteri già descritti in precedenza. Per questo motivo i risultati ottenuti sono da ritenersi parziali, tuttavia, permettono di descrivere in modo fedele la distribuzione dei principali sierotipi di *H.parasuis* circolanti sul nostro territorio. Questa distribuzione è risultata essere sovrapponibile a quella riportata in altri paesi europei da diversi Autori (tabella 2), con la netta prevalenza di 3 sierotipi: il sierotipo 4 (34%), il sierotipo 13 (22,7%) ed il sierotipo 5 (15,9%). I ceppi non tipizzabili nei sierotipi 2, 4, 5, 12 e 13 sono risultati essere il 22,7% di quelli esaminati. Nonostante non sia possibile stabilire quale sia la reale percentuale dei ceppi realmente non tipizzabili o non tipizzabili con gli antisieri utilizzati nel presente lavoro, il dato ottenuto risulta sovrapponibile con quanto riportato in altri lavori scientifici sull'argomento (tabella 2).

Alcuni autori riportano dati comparativi che indicano come l'immunodiffusione in gel di agar fornisca risultati meno soddisfacenti rispetto alla emoagglutinazione indiretta nella tipizzazione dei ceppi di *H.parasuis* (Del Rio et al., 2003; Tadjine et al., 2004). Quest'ultima infatti sarebbe in grado di abbassare di diversi punti percentuali il numero dei ceppi non tipizzabili. Tuttavia, in un recente studio di comparazione tra le due metodiche, riguardante l'attività di sierotipizzazione di ceppi di *H.parasuis*, non sarebbero emerse sostanziali differenze (Turni and Blackall, 2005).

Il dato che si evince dalla valutazione dei risultati indicati in tabella 3, che riporta l'associazione tra il sierotipo isolato e le lesioni anatomopatologiche rilevate, è la maggior prevalenza del sierotipo

4 in forme sistemiche piuttosto che in casi di coinvolgimento esclusivo delle vie respiratorie (broncopolmonite). Al contrario l'isolamento dei sierotipi 5 e 13 da suini con presenza o assenza di quadri di polisierosite è sovrapponibile, mentre i ceppi non tipizzabili sono risultati essere più frequentemente associati alle forme cosiddette non sistemiche. Dato il numero relativamente esiguo di ceppi impiegati, le differenze osservate non risultano statisticamente significative. Ad ogni buon conto, questa osservazione, che necessita di conferma, realizzabile attraverso la valutazione nel prossimo futuro di un numero maggiore di ceppi di *H.parasuis*, è in netto contrasto con quanto riportato da Angen et al. nel 2004, che descrive una maggior prevalenza del sierotipo 4 in forme non sistemiche rispetto a quelle sistemiche (polisierosite). Nello stesso lavoro la maggior parte dei ceppi non tipizzabili è stata isolata prevalentemente da casi con infezione sistemica. Questi risultati conflittuali possono essere dovuti all'elevata variabilità sia genetica sia del grado di virulenza, anche tra ceppi appartenenti allo stesso sierotipo (Blackall et al., 1996). Sulla base di queste osservazioni la classificazione di un ceppo di *H.parasuis* in un determinato sierotipo non dev'essere considerata come criterio per la valutazione della virulenza. In aggiunta a questo, i fattori ambientali, la presenza di altri patogeni batterici e virali, i trattamenti terapeutici, i trattamenti vaccinali e fattori legati all'ospite, possono giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia influenzando l'evoluzione di quest'ultima nella forma sistemica o in quella esclusivamente broncopolmonare (Angen et al., 2004).

Sulla base dell'esperienza maturata nell'attività svolta nel presente lavoro si conferma la difficoltà di isolamento del patogeno, soprattutto quando le condizioni del materiale patologico conferito non sono ottimali. Nei casi in cui non risulta possibile l'isolamento, la presenza di *H.parasuis* può essere dimostrata con l'impiego della PCR. Tuttavia, l'isolamento del patogeno rimane una condizione necessaria per l'ulteriore caratterizzazione e comparazione degli isolati, nonché per la valutazione in vitro della sensibilità agli antibiotici, per la quale esiste una grande variabilità tra ceppi isolati in aree geografiche diverse (De La Fuente et al., 2007).

Come evidenziato nei risultati, *H.parasuis* è stato isolato in concomitanza con altri agenti batterici, tuttavia non è facilmente ipotizzabile se da considerarsi come patogeno primario o secondario negli allevamenti con infezioni miste (Cai et al., 2005). Questo dato, sommato alla eventuale presenza di patogeni virali come PRRSV e PCV2, dev'essere considerato nel valutare i risultati ottenuti con la vaccinazione, soprattutto quando questa viene scelta come metodo principale di controllo della malattia (Cai et al., 2005).

BIBLIOGRAFIA

1. Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Angen O. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet. Microbiol.* 101, 143-146.
2. Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004). Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology* 103, 255-258.
3. Bak H., Riising H.J. (2002). Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*. *Vet. Rec.* 151, 502-505.
4. 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.
5. Bonilauri P., Guazzetti S., Barbieri G., Casali M., Franchi L., Luppi A., Calzolari M., Merialdi 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.

6. 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.
7. 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.
8. Kielstein P., Wuthe H., Angen O., Mutters R., Ahrens P. (2001). Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenic importance. *Vet. Microbiol.* 81, 243-255.
9. De la Fuente A.J.M., Tucker A.W., Navas J., Blanco M., Morris S.J., Gutiérrez-Martín C.B. (2007). Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. *Veterinary Microbiology* 120, 184-191.
10. Del Rio M.L., Guitierrez C.B., Rodriguez Ferri e.F. (2003). Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology* 23, 1022-1025.
11. 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.
12. Oliveira S. and Pijoan C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary microbiology* 99, 1-12.
13. 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.
14. Olivera S., Pijoan C. (2002). Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. *J Swine Health Prod* 10, 221-225.
15. 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.
16. Rapp-Gabrielson V. J., Gabrielson D.A. (1992). Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am. J. Vet. Res.* 53:659-664.
17. Rúbies 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.
18. 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.
19. Turni C., Blackall P.J. (2005). Comparison of the indirect haemoagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology* 106,145-151.