

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* DE AISLAMIENTOS REALIZADOS A PARTIR DE CASOS CLÍNICOS EN CERDOS.

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 16 de Junio de 2021

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* DE AISLAMIENTOS REALIZADOS A PARTIR DE CASOS CLÍNICOS EN CERDOS

Trabajo Final de Grado

de la alumna

GIULIANA FERRARI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

Med. Vet. (M. Phil.) Angel Patitucci

Co-Director

MSc. Med. Vet. Fernando Aníbal Bessone

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 16 de Junio de 2021

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
1.2. CARACTERÍSTICAS DE <i>GLAESSERELLA PARASUIS</i>	7
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	9
1.4. PATOGENICIDAD Y SEROTIPOS	10
1.5. CUADROS PATOLÓGICOS EN PRODUCCIÓN PORCINA.....	11
1.6. DIAGNÓSTICO	12
1.7. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.....	14
1.8. <i>GLAESSERELLA PARASUIS</i> EN ARGENTINA.....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
2.1. HIPÓTESIS.....	18
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	18
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS	20
3.2. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO Y EXTRACCIÓN DE ADN.....	20
3.3. REACCIÓN DE PCR	20
3.4. REVELADO E INTERPRETACIÓN.....	22
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN	35
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXO.....	41

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a la UNNOBA por permitirme ser parte de la universidad y estudiar la carrera de licenciatura en genética, a los profesores por brindarme su conocimiento y ayudarme en el recorrido.

Expreso mi entero agradecimiento a Fernando por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo, y guiarme en la elaboración del mismo. También, al grupo de Sanidad Animal de INTA Marcos Juárez por su compañerismo y hacerme participe de los proyectos del grupo.

Estoy eternamente agradecida a Claudio y Adriana, mis padres, pilares de mi vida, que me acompañaron en este camino y me apoyaron en todo momento. A Renzo, mi hermano, que a pesar de su corta edad, me brindó su apoyo y consejos. A Francisco, mi novio, compañero de vida, quien me motivó a no bajar los brazos, me acompañó en las buenas y me abrazó y contuvo en las malas.

Por último, agradezco a familiares y amigas que me impulsaron a seguir adelante y siempre me dieron una mano.

Gracias, gracias, gracias.

RESUMEN

Glaesserella parasuis es una bacteria gram negativa pequeña, miembro de la familia Pasteurellaceae, que requiere del factor V (nicotidamina adenina dinucleótido) para crecer en cultivo. Es la causante de la Enfermedad de Glässer, la cual genera poliserositis en cerdos en etapa de recría. Hasta la fecha, presenta 15 serotipos que van de un alto rango de virulencia a ser no virulentos. En este estudio se llevó a cabo la caracterización y la tipificación de la bacteria, a partir de casos clínicos de cerdos. Las cepas/muestras fueron tomadas de granjas y criaderos porcinos ubicados en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, San Juan y Entre Ríos y fueron procesadas y cultivadas en agar sangre. Luego, se comprobó la virulencia de *Glaesserella parasuis* y qué serotipos se presentan mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Por último, se realizó un análisis de frecuencia y correlación entre cepas virulentas y no virulentas, y los serotipos encontrados.

Se determinó que el serotipo más frecuente fue el 1 seguido por 5 y 12, 4 y en menor frecuencia los serotipos 13 y 7. Se aislaron mayor cantidad de cepas en Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe, y menor cantidad en Entre Ríos y San Juan. Es decir, que se descubrió una mayor y nueva circulación de serotipos en distintas provincias, no descrito en trabajos anteriores.

La información obtenida a partir de este estudio de *Glaesserella parasuis* permite conocer en profundidad la bacteria que causa pérdidas económicas significativas en la industria porcina en todo el mundo. Asimismo, genera un precedente de la circulación y prevalencia de ésta en nuestro país, otorgando nuevas herramientas y estrategias para el diagnóstico y la elaboración de vacunas autóctonas para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Glässer.

INTRODUCCIÓN

1.1. Historia

Los cerdos representan el 36 % del total de carne producida a nivel mundial. La producción porcina (animal) está presente en todos los continentes, y la salud, es uno de los factores más importantes de productividad, rentabilidad y bienestar animal en producción porcina (Costa-Hurtado *et al.* 2020).

La producción de cerdos en Argentina comienza a transitar un camino de oportunidades que la llevarán al desarrollo y a la consolidación, lo cual implica enfrentar desafíos y amenazas. En 2002, luego de la devaluación de la moneda, las condiciones macroeconómicas para la producción porcina mejoraron considerablemente, especialmente por el encarecimiento del cerdo importado y el mejoramiento de los precios internos en términos reales. Esto permitió que se vislumbrara una clara recuperación de la actividad porcina (Brunori 2013).

En los últimos años, los sistemas de producción del sector vivieron un proceso de transformación. Si bien los sistemas de producción de pequeña y mediana escala productiva (10 a 200 madres) son los que prevalecen en el país, se ha producido un importante aumento en el número de productores de mayor escala (100 madres), convirtiéndose en empresas tecnificadas de mayor eficiencia productiva (Brunori 2013).

La adopción de nuevas tecnologías de producción para las piaras de alto nivel de salud y la emergencia de nuevos síndromes respiratorios ha contribuido al aumento en el predominio y gravedad de la enfermedad de Glässer (Straw 2000). Esta enfermedad, causada por *Glaesserella parasuis*, está asociada a cerdos de 4 a 12 semanas y se caracteriza patológicamente por poliserositis y poliartritis fibrinosas.

1.2. Características de *Glaesserella parasuis*

Glässer (1910) fue el primero en describir la asociación de un bacilo gram negativo pequeño con la serositis y artritis fibrinosa del cerdo (Straw 2000).

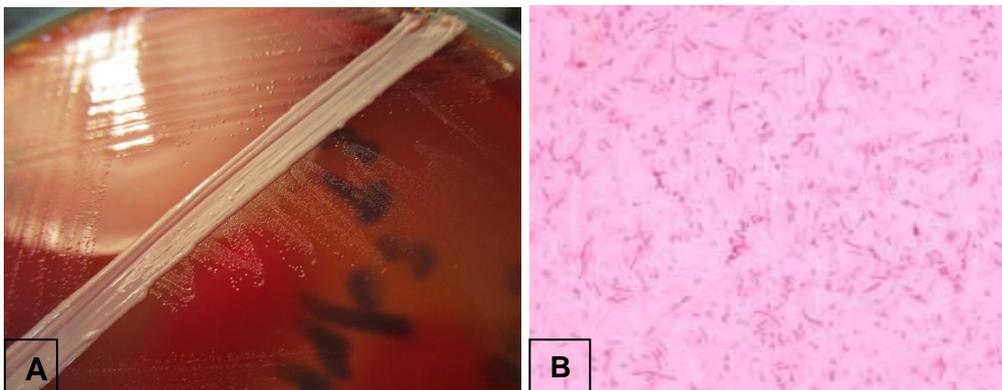
Inicialmente, el agente causal fue identificado como *Haemophilus suis* por Hjarre y Wramby (1943) y como *Haemophilus influenza suis* por Lecce (1960). Luego, el nombre cambió a *Haemophilus parasuis* en base a la demostración de que el microorganismo no requería factor X (hemina y otras porfirinas) para su crecimiento (Straw 2000). Actualmente, *Haemophilus parasuis* ha sido renombrado en el NCBI como *Glaesserella*

parasuis (*G. parasuis*) (Lin *et al.* 2019).

G. parasuis es una bacteria gram negativa pequeña, miembro de la familia Pasteurellaceae, que requiere del factor V (nicotidamina adenina dinucleótido, NAD) para crecer en cultivo (Zimmerman 2012). Esta bacteria es residente del tracto respiratorio superior de los cerdos (Zhang *et al.* 2019) y posee una considerable heterogeneidad genotípica entre cepas (Straw 2000).

Microscópicamente, las células de *G. parasuis* son pequeñas y pleomórficas variando entre cocobacilos aislados de cadenas largas, delgadas y filamentosas (Straw 2000). Comúnmente, son aisladas de secreciones nasales de cerdos sanos y de los pulmones de cerdos con neumonía. También, las muestras más adecuadas para un posible aislamiento son fragmentos de las membranas serosas inflamadas, exudados pericárdico, torácico y abdominal, sangre del corazón y líquido cefalorraquídeo de animales afectados por la forma aguda de la enfermedad y que no hayan recibido ningún tipo de medicación antibacteriana durante, al menos, los 7 días previos a la toma de muestras (López 2011). Estas bacterias pueden ser cultivadas en agar chocolate o agar sangre. Junto al agar sangre se cultiva una estría de *Staphylococcus epidermidis*, mostrando el crecimiento en satélitosis característico (Zimmerman 2012).

Figura 1 *G. parasuis* en Placa de Petri (A) y Tinción de Gram (B).



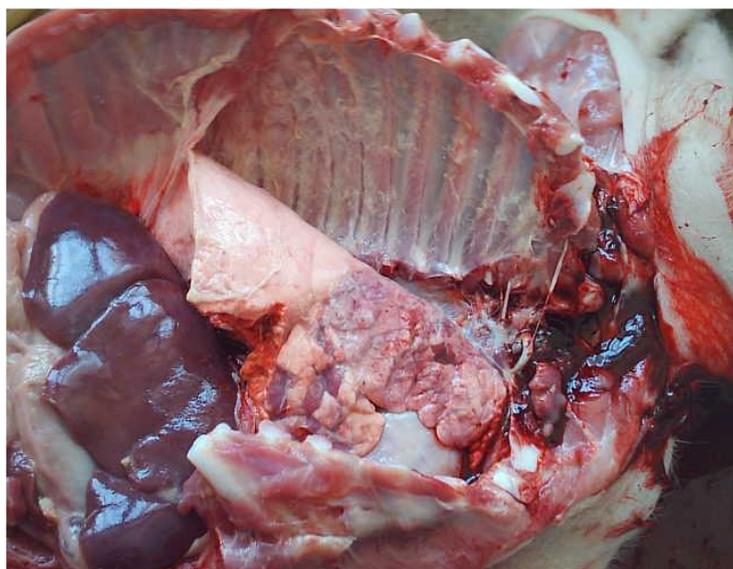
Fuente: Foto cedida por el grupo de Sanidad Animal de INTA Marcos Juárez.

1.3. Epidemiología

Históricamente, la enfermedad de Glässer ha sido considerada una enfermedad esporádica de los cerdos jóvenes afectados por el estrés (Straw 2000). También, se manifiesta de forma característica después del destete, se asocia con la pérdida de anticuerpos de origen materno y la presencia endémica de la bacteria en los rebaños (Howell et al. 2015). Sin embargo, el cuadro epizootológico en piaras libres de patógenos específicos (LPE) o de alto nivel de salud, que representan una población inmunológicamente no estimulada es muy diferente. La introducción de *G. parasuis* puede producir una enfermedad sistémica de alta morbilidad y mortalidad, que afecta a cerdos en cualquier fase de producción (Straw 2000).

El papel de esta bacteria en la enfermedad respiratoria del cerdo es aún más problemático. La colonización de *G. parasuis* asociado con enfermedades como rinitis purulenta es predisponente para otros patógenos víricos y bacterianos (Straw 2000). Recientemente, se observó que la coinfección por *G. parasuis* con otros patógenos, como circovirus, *Streptococcus suis* (SS) y *Pasteurella multocida* (Pm) (Liu et al. 2017), conducen a un aumento de mortalidad en los cerdos.

Figura 2: Pleuritis fibrinosa provocada por *G. parasuis*



Fuente: Foto cedida por el grupo de Sanidad Animal de INTA Marcos Juárez.

En varios estudios se descubrió que hay una asociación entre los distintos serotipos aislados a partir de la poliserositis y la virulencia (Straw 2000).

La prevalencia de los diferentes serotipos es distinta en cada país. En Argentina están presentes los serotipos 4 y 5 (López 2011), en Japón, Alemania, Estados Unidos, Canadá y Australia los serotipos prevalentes son 5, 4 y 13 (Straw 2000).

1.4. Patogenicidad y serotipos

La existencia de serotipos fue descrita por primera vez por Bakos y col. (1952) (Straw 2000) . Hasta la fecha, *G. parasuis* presenta 15 serotipos que van de un alto rango de virulencia a ser no virulentos. Los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14 y 15 son virulentos y los serotipos 6, 7, 9 y 11 no virulentos (Olvera *et al.* 2012). En los pulmones, las cepas no virulentas de *G. parasuis* pueden ser eliminadas por fagocitosis por macrófagos. Por el contrario, las cepas virulentas de *G. parasuis* pueden evitar la fagocitosis por macrófagos alveolares, probablemente debido, al menos en parte, a la producción de la cápsula. En presencia de anticuerpos opsonicos, las cepas virulentas se vuelven susceptibles a la fagocitosis por los macrófagos y luego se destruyen (Costa-hurtado y Aragon 2013).

Antiguamente, se creía que la serovariedad de *G. parasuis* producía antígenos termoestables, como el antígeno del polisacárido capsular (CPS) y el lipopolisacárido (LPS) o lipooligosacárido (LOS), de una manera dependiente de la cepa. Hay muchos genes ubicados en el *locus* CPS (Aiqing *et al.* 2017). La mayoría de los serotipos pueden distinguirse por las variaciones de secuencia que codifican la cápsula bacteriana, excepto los serotipos 5 y 12 (Liu *et al.* 2016). El serotipo 5 se encuentra entre los aislados más epidémicos y conduce a una alta mortalidad y morbilidad en los cerdos, causando enormes pérdidas económicas en la industria porcina mundial. En otro estudio posterior, se investigó la cadena más virulenta del serotipo 5, que dilucidó mecanismos de inflamación mediado por varias cascadas de señalización inflamatoria (Yue *et al.* 2019).

Recientemente, se diseñó un nuevo cebador, H12, que es de gran utilidad para la detección del serotipo 12, pudiéndolo diferenciar del 5 (Aiqing *et al.* 2017).

La identificación de factores de virulencia en *G. parasuis* podría mejorar enormemente la diferenciación entre cepas y permitiría el diseño de nuevas vacunas para prevenir

enfermedades (Costa-hurtado y Aragon 2013). Sin embargo, dado a que no se cuenta con demasiada información acerca de antígenos protectores y factores de virulencia, es improbable que cualquier bacteria proporcione inmunidad cruzada contra todas las cepas de importancia etiológica en la población porcina (Straw 2000).

1.5. Cuadros patológicos en producción porcina

Cuando el huésped sufre una situación de estrés ambiental o inmunidad reducida, *G. parasuis* puede extenderse a los pulmones y causar neumonía o incluso entrar en la circulación sanguínea e invadir múltiples tejidos para causar la enfermedad de Glässer sistémica (Wang *et al.* 2018). Los lechones muestran lesiones características de poliserositis fibrinosa y ocasionalmente neumonía catarral purulenta, en el examen de autopsia (post mortem). En casos donde los animales están crónicamente afectados, pueden mostrar reducción, crecimiento y lesiones de poliserositis fibrinosa en la necropsia (Costa-Hurtado *et al.* 2020). Las membranas sinoviales aparecen inflamadas y pueden poseer un gruesa capa de fibrina que en ocasiones se desprende y se inserta entre las superficies articulares (López 2011). También, hay presencia de lesiones macroscópicas (endocarditis valvular, peritonitis, artritis, hiperemia meníngea, meningitis supurativa, pericarditis sero-hemorrágica) aunque en los casos peragudos pueden no observarse lesiones macroscópicas (Zielinski 2006).

Además, los signos clínicos incluyen pirexia y apatía seguidas por inapetencia y anorexia, luego pueden aparecer disnea, dolor, cojera, temblor, cianosis y muerte (Straw 2000). Las lesiones septicémicas consisten en petequias o equimosis en el hígado, riñón y meninges (Straw 2000).

Esta enfermedad produce que la respiración en los cerdos se vuelva superficial y ligeramente acelerada, observándose con cierta frecuencia tos y descargas nasales. A nivel de orejas, hocico, abdomen y extremidades es posible la detección de áreas de cianosis debidas a un fallo en la circulación periférica. En ciertas ocasiones, se aprecia conjuntivitis y edema subcutáneo en párpados y orejas. Una o varias articulaciones en un mismo animal pueden inflamarse, apareciendo cojera (López 2011).

Los animales enfermos tienen dolor, éste se manifiesta en forma de chillidos, rechinar de dientes y arqueamiento dorsal. A medida que el cuadro evoluciona, la respiración se hace

dificultosa, algunos cerdos llegan a vomitar, hay resistencia al movimiento y pueden aparecer síntomas nerviosos indicativos de meningitis como temblores, incoordinación, pedaleo, convulsiones y opistótonos, con desenlace generalmente fatal, aunque la muerte puede aparecer también súbitamente (López 2011).

Cuando la infección se da en reproductores que no han tenido contacto previo con *G. parasuis*, el cuadro anterior puede verse complicado con abortos y repeticiones achacables a la fiebre y a la pérdida de la condición corporal (López 2011).

1.6. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad comienza en la granja, en la historia de la piara, con la observación de signos clínicos, seguidos de un diagnóstico patológico (Costa-Hurtado *et al.* 2020).

Las necropsias deben realizarse no sólo en cerdos con signos clínicos y lesiones graves, sino también en los cerdos en la fase aguda de la enfermedad, antes de la administración de antibióticos (Straw 2000).

Aunque son laboriosas las técnicas bacteriológicas para el diagnóstico de rutina, son usadas con éxito, técnicas de dilución seguida de plaqueo en medios de cultivo selectivo que contiene antibióticos para cultivar *G. parasuis* en grandes cantidades a partir de muestras respiratorias (Straw 2000).

La serotipificación de *G. parasuis*, nos ayuda a comprender la epidemiología de la enfermedad y a controlar la prevalencia del serotipo (Aiqing *et al.* 2017), así como también favorecer el desarrollo de vacunas (Lin *et al.* 2019).

Se han descrito diferentes técnicas, para la serotipificación del agente, entre ellas es el test de inmunodifusión usando antígenos autoclavados (Zanolli Moreno *et al.* 2011) que fue reemplazado por los ensayos de hemaglutinación indirecta (IHA) (Lin *et al.* 2019). Éste último, está basado en elegir la reacción de aglutinación más fuerte como el resultado principal, pero esto puede depender de la interpretación visual del trabajador, por lo que se introduce el error humano en la prueba (Howell *et al.* 2015). Existen otros inconvenientes como la dificultad de producir sistemáticamente antisueros específicos contra varias cepas de referencia, la variación en las condiciones de crecimiento o las tasas de crecimiento entre aislamientos, el número muy pequeño de laboratorios que

actualmente realizan esta prueba y la repetibilidad. Estas dificultades hacen que IHA sea poco confiable y difícil de realizar. Sin embargo, aumentó la proporción de cepas tipificables de un 60% a un 80% con respecto a la inmunodifusión (Howell *et al.* 2015).

Más tarde, se aplicaron novedosas técnicas moleculares como PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), que fue de gran utilidad por su rapidez y eficacia. En esta técnica se usan cebadores para amplificar genes específicos de serotipos, siendo éste el método más eficaz y rápido para la identificación y diferenciación de serotipos (Aiqing *et al.* 2017).

También, se emplearon algunas variantes de PCR como ERIC-PCR, la Reacción en cadena de la Polimerasa Consenso Intergénica Repetitiva Enterobacteriana, es un método de genotipado basado en secuencias repetidas de enterobacterias conjugadas (Zhao *et al.* 2018). Ésta consta en la amplificación de las secuencias de ADN a través de la PCR, usando cebadores específicos para cada tipo de secuencia. El polimorfismo detectado resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas, causadas por inserciones o deleciones del ADN. Usando estas secuencias ha sido posible, discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie, y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (López-Ramírez *et al.* 2018). Ésta técnica demostró ser capaz de tipificar todos los aislamientos según el origen y serotipo en un corto período de tiempo y a bajo costo (Zanolli Moreno *et al.* 2011). El genotipado molecular por ERIC-PCR es más rápido y menos costoso que otras técnicas de tipificación para generar información sobre la similitud genética de cepas bacterianas. Los cebadores ERIC-PCR están diseñados para poder unirse a secuencias repetidas en bacterias como *Escherichia coli* y luego amplificar las distancias entre esos cebadores unidos a secuencias repetidas. Se espera que las variaciones en la ubicación y el número de secuencias ERIC entre cepas de *E. coli* no relacionadas den como resultado diferencias en el número y tamaño de los productos de la PCR, lo que da como resultado diferencias en los patrones de bandas cuando los productos se separan por electroforesis (Talaat *et al.* 2020).

Otra variante muy utilizada es la Multiplex PCR (mPCR) basada en la incorporación de varios cebadores dentro de un tubo de reacción para amplificar los fragmentos genómicos de muchos patógenos o como en este caso la detección simultánea de muchos serotipos. La aplicación de esta técnica minimizó los tiempos y redujo los costos de los reactivos, y también, minimizó posibles fuentes de error de laboratorio. La mPCR es una estrategia

validada para la detección rápida y la identificación precisa (Huang *et al.* 2018). Además, es transferible a un laboratorio de diagnóstico molecular con equipo básico, y se puede realizar en ADN crudo derivado directamente de colonias bacterianas (Howell *et al.* 2015). Actualmente se siguen utilizando los métodos tradicionales, como también estos nuevos métodos moleculares.

Las técnicas antes mencionadas se han desarrollado para otras bacterias basadas en los genes implicados en la biosíntesis de estructuras de polisacáridos extracelulares, como los LPS o las cápsulas, y es probable que estos sean los componentes dominantes de los antígenos serotipados para *G. parasuis*. En un análisis de la primera secuencia completa del genoma de *G. parasuis* se identificó una región de biosíntesis de polisacárido de 14 kb que se propuso para codificar el antígeno O. Más tarde se propuso que este locus de cápsulas grupo 1 basado en la presencia de los homólogos de los genes *wza*, *wzb* y *wzc* es el responsable de una considerable variación específica de serotipos. Además, se descubrió que existe una fuerte asociación entre la presencia de loci de cápsulas y de los serotipos (Howell *et al.* 2015).

1.7. Tratamiento y prevención

Ante un brote agudo de la enfermedad de Glässer, se impone la rápida instauración de una terapia antibiótica. La lista de antimicrobianos recomendados por la mayoría de los autores incluye penicilina, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, cefquinoma, oxitetraciclina, doxiciclina, etc, colocando a la penicilina como el antibiótico de primera elección, posición de la que progresivamente ha ido siendo desplazada por los demás antibióticos debido a la creciente incidencia de resistencias (López 2011). En muchas circunstancias, se realizan tratamientos continuos de varios meses después de un brote, a los lotes de cerdos susceptibles para asegurar su recuperación completa. No obstante, es motivo de preocupación que se genere resistencia a los antimicrobianos por el uso prolongado de estos medicamentos. En China y España se ha informado de resistencia a los antimicrobianos en *G. parasuis*, donde la mayoría de las cepas son resistentes a enrofloxacin y trimetoprim (Howell *et al.* 2015). Por este motivo en China, los fármacos de elección son la tilmicosina y el florfenicol para la prevención y el tratamiento de las infecciones por *G. parasuis* (Zhang *et al.* 2019).

El método para controlar la enfermedad de Glässer es generar un programa de vacunación, donde hay que tener en cuenta la inmunidad maternal, ya que es efectiva frente al desafío por *G. parasuis*. Ésta inmunidad dura entre 4 y 5 semanas (López 2011). La vacunación de las cerdas es menos laboriosa y pretende aumentar el nivel de anticuerpos en el calostro que deben tomar los lechones (Cerdà-Cuéllar *et al.* 2010). Por lo que en casos precoces, es decir, en lechones de edades inferiores a las 6 semanas, se recomienda la vacunación de sus madres, mientras que cuando la enfermedad aparece a partir de esa edad, está indicada la vacunación de los lechones (López 2011).

Las vacunas en muchos casos no son eficaces y esto puede deberse a la falta de protección cruzada para la cepa o los serotipos involucrados en el proceso de la enfermedad (Straw 2000).

En Argentina existe la inmunización con la vacuna Hiprasuis Glässer, la cual consta de bacterinas, que proporcionan una protección dependiente de serovariedad, en este caso frente al serotipo 1 y 6. Es segura, eficaz, económicamente viable y reduce la mortalidad y morbilidad de cerdos infectados (Zeng *et al.* 2013). No posee contraindicaciones. Asimismo, los resultados indican que el nivel de anticuerpos en el calostro es mayor (medido indirectamente por el nivel de anticuerpos en lechones en 3 días de edad) y refleja, que es mejor el efecto de la vacunación de la cerda que los anticuerpos séricos (Cerdà-Cuéllar *et al.* 2010). Por lo tanto, la vacunación de las madres no solo reduce la colonización del tracto respiratorio superior de los lechones, sino también la variabilidad de las cepas de *G. parasuis* que los colonizan. Esta reducción del transporte de *G. parasuis* en cerdos pequeños podría ser el mecanismo subyacente para controlar la enfermedad mediante la vacunación sus madres (Cerdà-Cuéllar *et al.* 2010).

Como conclusión los programas de control deben incluir vacunación, tratamiento contra antibióticos, pero también deben ocuparse de las prácticas de manejo para reducir o eliminar otros agentes patógenos respiratorios, restringir la edad del destete y el flujo de animales, y eliminar la mezcla de cerdos en todas las etapas de producción (Straw 2000).

1.8. Glaesserella parasuis en Argentina

La importancia del estudio sobre *G. parasuis* se debe a que, la Enfermedad de Glässer causa pérdidas económicas significativas en la industria porcina en todo el mundo (Liu

et al. 2016).

En Argentina, está confirmada la presencia de la especie (Zielinski y Blackhall, 1997), aunque no se han realizado exhaustivos estudios epidemiológicos para determinar su difusión (Zielinski 2006). A su vez, cabe señalar que sólo existen vacunas contra el serotipo 4 y 5, por tanto si se utilizara esta vacuna en granjas infectadas contra los serotipos 15 y 7, resultarían ineficaces ya que no existen las reacciones cruzadas inmunológicas entre serotipos. De allí el interés de conocer el serotipo que infecta a cada granja, estudio que actualmente y salvo la remisión de los aislamientos al extranjero, no se realiza en el país (Zielinski 2006).

Por lo tanto, es de gran importancia averiguar la circulación de los diferentes serotipos de la bacteria en nuestro país. Asimismo, generar vacunas autóctonas a partir del conocimiento de los serotipos circulantes.

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

En Argentina se encuentra más de un serotipo de la bacteria *Glaesserella parasuis* en cerdos.

2.2. Objetivo general

Caracterizar *Glaesserella parasuis* a partir de aislados de casos clínicos de cerdos.

2.3. Objetivos específicos

- Confirmar la presencia de *Glaesserella parasuis* en los aislados de casos clínicos de cerdos, a partir de gen especie-específico por PCR.
- Tipificar las cepas en cuanto a los diferentes serotipos.
- Determinar la correlación de los serotipos con la virulencia de las cepas, las estaciones del año y a lo largo de los años.
- Evaluar la distribución de los serotipos por regiones en Argentina.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

3.1. Descripción de las cepas

Se trabajó con 75 cepas de *G. parasuis*, aisladas a partir de casos clínicos de cerdos en etapa de recría. Dichas cepas fueron identificadas por técnicas bacteriológicas a partir de muestras obtenidas de criaderos porcinos ubicados en la provincia de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. El trabajo de laboratorio se realizó en la Estación Experimental INTA Marcos Juárez, Ruta 12 km 3.

3.2. Aislamiento bacteriológico y extracción de ADN

Los aislados provienen de muestras de cerdos sintomáticos como pulmones, líquido pleural, líquido peritoneal y líquido pericárdico. La siembra se realizó sobre el medio de cultivo agar sangre con estría de *Staphylococcus epidermidis*, la cual aporta factor V al medio, las colonias tienen un crecimiento en forma de satélitis a 37°C grados en la estufa de cultivo.

Para la extracción del ADN, se utilizó el método de boiling (Howell *et al.* 2015). Primero se tomó a las bacterias desde el agar sangre, se las depositó en un Eppendorf con 300 µl de H₂O Ultra Pura. Luego, se las sometió a un baño térmico a 100°C por 10 minutos, luego se colocaron los mismos tubos a -20°C por 2 minutos. Una vez pasado este proceso los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 4 minutos. Por último, se tomó 100 µl del sobrenadante en tubos estériles nuevos para el almacenamiento de las muestras de ADN hasta su uso (Howell *et al.* 2015).

Para verificar la calidad de la extracción de ADN, se evaluó la concentración de cada muestra en el NanoDrop 8000 Thermo Scientific.

3.3. Reacción de PCR

Se caracterizó al agente patógeno por sus serotipos siguiendo la reacción de PCR descrita por Howell *et al.* (2015). Para ello, se puso a punto la técnica. Se utilizó un gen especie específico en cada muestra analizada (Howell *et al.* 2015).

Se realizaron PCR para cada uno de los serotipos.

Los tubos de reacción contuvieron 6,5 µl de Master Mix Promega, 0,5 µl de primer

(especie específico y de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 12, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 y 15), 3 µl de ADN , 0,5 µl MgCl₂ ,13,2 µl de Ultra Pura H₂O y 0,2 µl de Taq Pegasus en un volumen final de 25 µl. Los ciclos constaron de un inicio a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. Se empleó el termociclador Applied Biosystems Veriti 96 well.

Se usó como control negativo H₂O pura y ADN de *Escherichia coli*; y como control positivo *G. parasuis* “Nagasaki” serotipo 5 (cepas de referencia cedido por Dr. MARCELO GOTTSCHALK, Full time professor, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (Canadá)).

Tabla 1. Genes de tipificación mencionados por Howell *et al.* (2015).

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Serotipo Tarjet	Tamaño pb
funB	CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC	GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	1	180
wzx	CTAACAAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGTG	GGCACTGAATAAGGGATAATTGTAAGT	2	295
glyC	CATGGTGTATCCTGACTTGGCTGT	TCCACATGAGGCCGCTTCTAATAACT	3	650
wciP	GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG	CTTCCACAACAGCTCTAGAAACC	4	320
wcwK	CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG	CCATACATCTGAATTCCTAAGC	5 o 12	450
gltI	GATTCTGATGATTTTTGGCTGACGGAACG	CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC	6	360
funQ	CTCCGATTTTCATCTTTTCTATGTGG	CGATAAACCCATAACAATTCCTGGCAC	7	490
scdA	GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG	CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG	8	650
funV	AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA	CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC	9	710
funX	GGTGACATTTATGGGCGAGTAAGTC	GCACTGTCTATCAATAACAATCTTAAGACG	10	790
amtA	CCATCTCTTTAACTAATGGGACTG	GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG	11	890
gltP	GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTGTTAC	CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	13	840
funAB	GCTGGTTATGACTATTTCTTTCGCG	GCTCCCAAGATTAACCACAAGCAAG	14	730
funI	CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC	CCTATATCATTTGTTGGATGTACG	15	550
HPS_219690793	ACAACCTGCAAGTACTTATCGGGAT	TAGCCTCTGTCTGATATTCACG	todos	275

También, se realizó PCR para evaluar la virulencia de las muestras. Se utilizaron los genes de virulencia descritos por Olvera *et al.* (2012).

Los tubos de reacción contuvieron 6,5 µl de Master Mix Promega, 1 µl de primer, 5 µl de ADN, 0,5 µl MgCl₂, 9,8 µl de Ultra Pura H₂O y 0,2 µl de Taq Pegasus en un volumen final de 25 µl. Los ciclos constaron de un inicio a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 52 °C por 45 seg, 72 °C por 30 seg y una extensión final de 72 °C por 7 min.

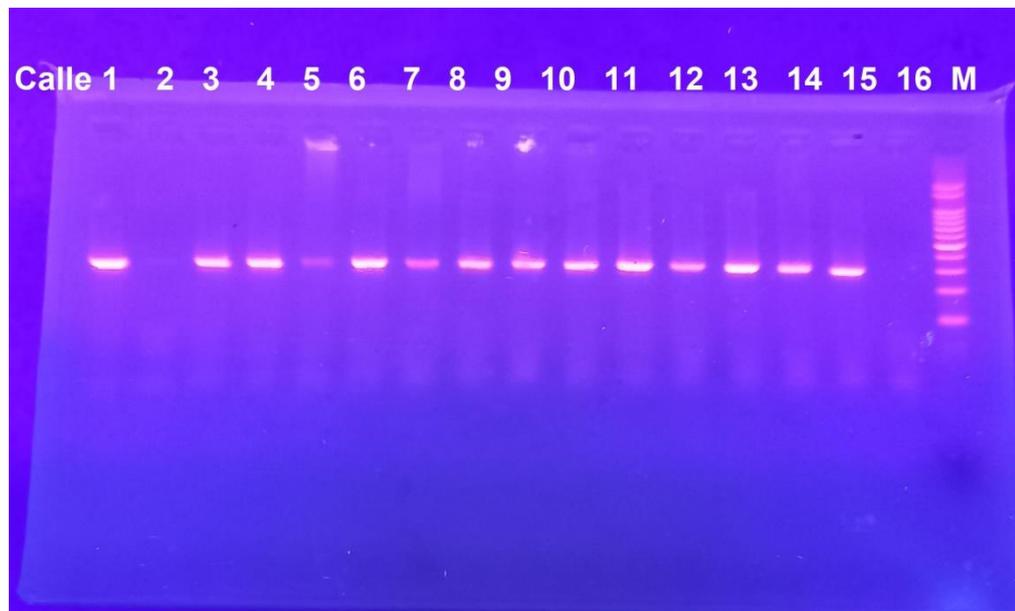
Tabla 2. Genes de virulencia vtaA mencionados por Olvera *et al.* (2012).

Primer	Secuencia	Tamaño en pb
V-AVF	AAATATTTAGAGTTATTTGGAGTC	
VIR-R	AATATACCTAGTATAACTAGACTTAAAAG	190
AVIR-R	CAGAATAAGCAAAATCAGC	222

3.4. Revelado e interpretación

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* 1X TBE con 5% *SYBR Safe dye* y se dejó correr a 100V, 45 minutos. Luego, se visualizó en el trans-iluminador UV TFX-20M. Por último, se realizó la interpretación de los resultados (Howell *et al.* 2015).

Figura 3. Revelación gel de agarosa con genes específicos de *G. parasuis*.



Se utilizó un marcador molecular de 100 pb (calle M). Las bandas positivas representan el gen especie-específico de *G. parasuis* de 275 pb.

3.5. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de tablas de frecuencias y gráficos para conocer las distribuciones de las variables. Luego se utilizaron tablas de contingencias utilizando el test exacto de Fisher para conocer si algunas de las variables como provincia, estación del año y años, estaban relacionadas a los serotipos encontrados. Se utilizaron los software SAS versión 2020 e Infostat versión 2020.

RESULTADOS

Los ADNs extraídos a partir de la colección de cepas, fueron analizados por NanoDrop, presentando buena calidad.

Los resultados que se obtuvieron a partir de las PCR realizadas para detectar *G. parasuis*, los serotipos y virulencia fueron:

De las 75 cepas 67 dieron positivas para *G. parasuis*, es decir un 89,3%. Solo 8 de las restantes dieron negativas, un 10,6%. De las cepas positivas, solo 6 quedaron sin tipificar.

Gráfico 1. Gráfico de tortas donde se muestran las frecuencias de los serotipos.

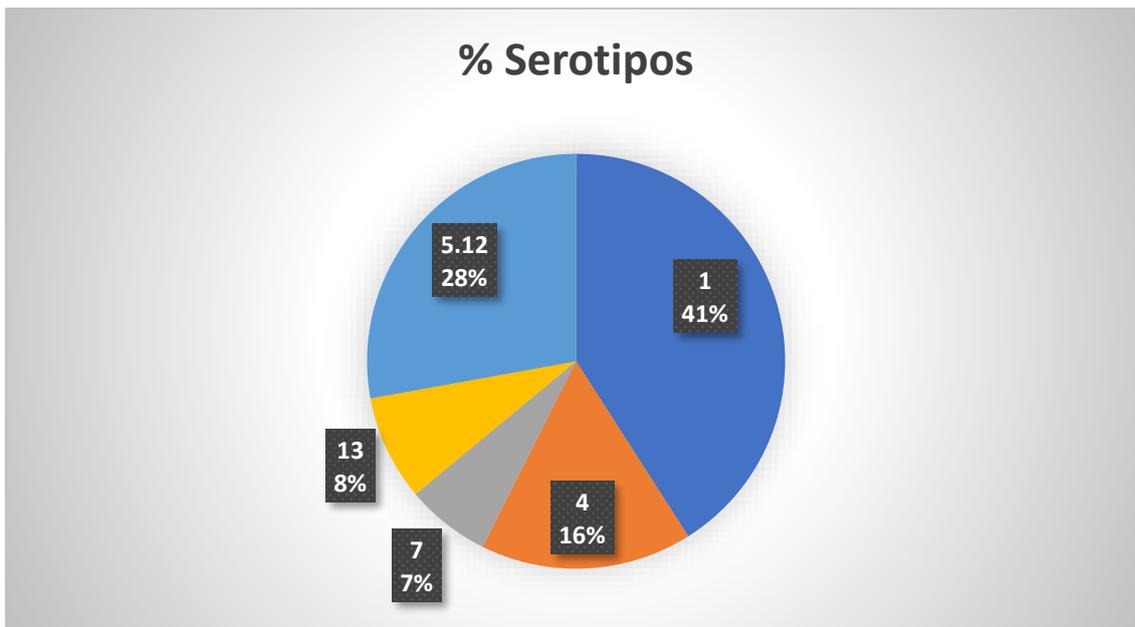
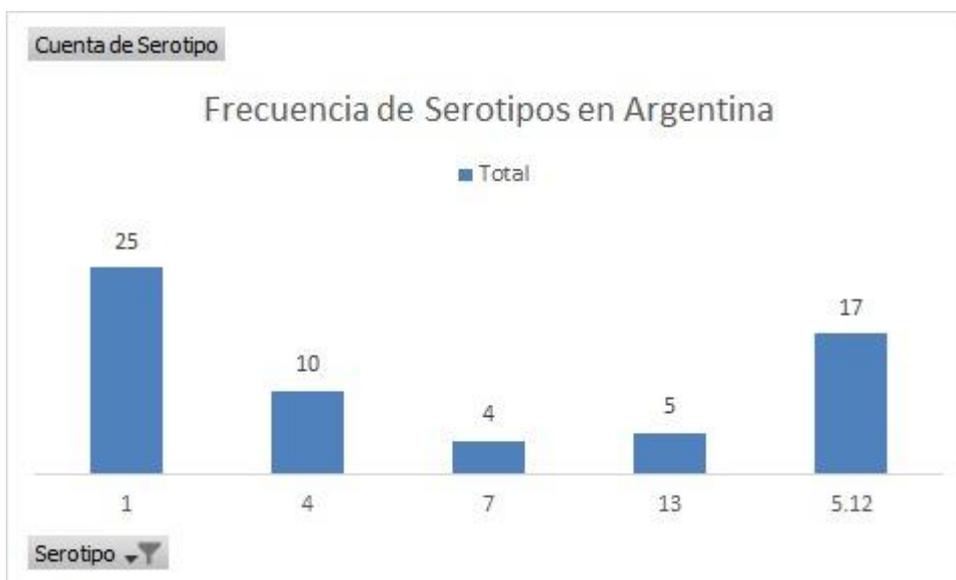
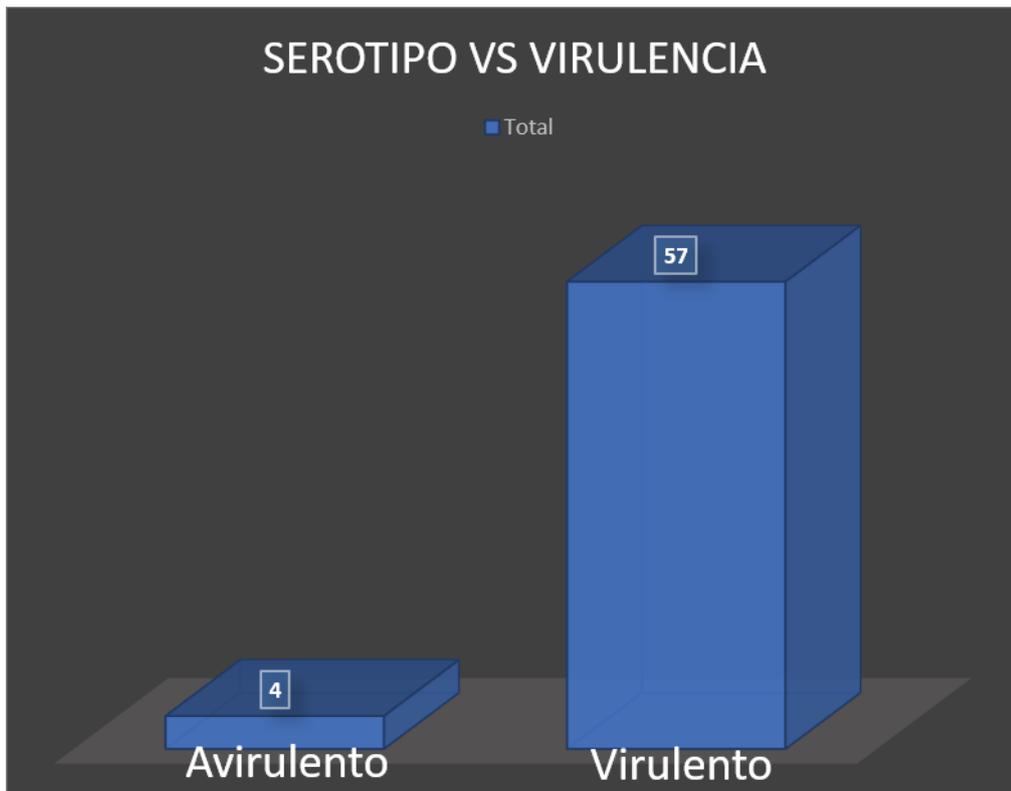


Gráfico 2. Gráfico de barras donde se muestra las frecuencias de los serotipos.



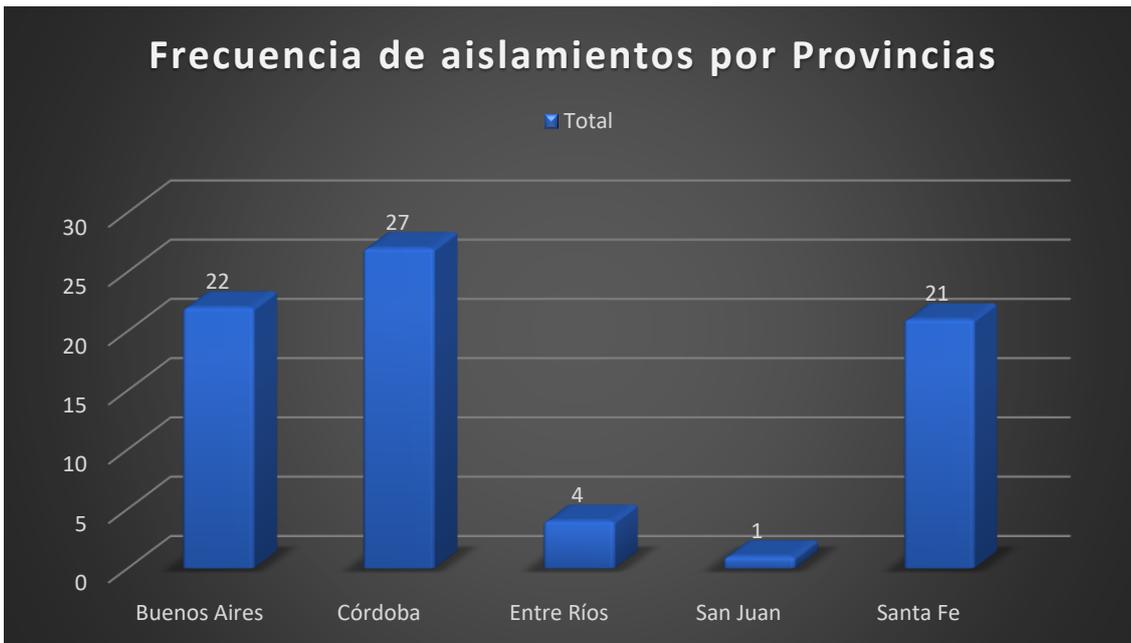
Se encontraron 5 serotipos. El serotipo 1 en mayor prevalencia con un 41% (25 cepas positivas), el serotipo 5 y 12 presentó 17 cepas positivas (25%), el serotipo 4 en un 16% (10 cepas positivas), el serotipo 13 presentó 5 cepas positivas (8%) y el serotipo 7 con menor prevalencia en un 7% (4 cepas positivas). Los demás serotipos no fueron encontrados.

Gráfico 3. Gráfico de barras donde se muestran los serotipos y la virulencia.



Se observó que 57 de las cepas dieron positivo para genes de virulencia. Dichas cepas correspondieron con 4 de los serotipos (1, 4, 5 y 12, 7) que se encontraron y son virulentos. Solo 4 cepas fueron avirulentas y se correspondió con el serotipo 7, que es avirulento.

Gráfico 4. Gráfico de barras donde se muestran las cepas según su lugar de aislamiento.



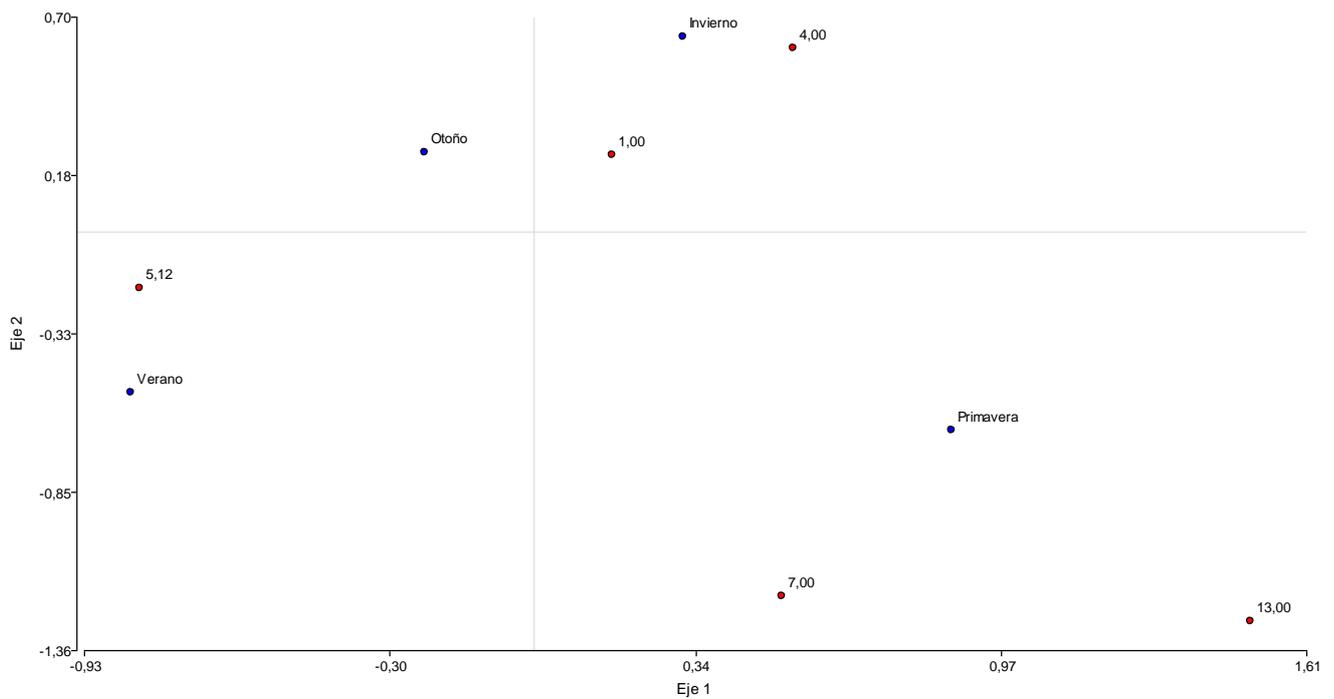
La mayor cantidad de cepas, se observó en Córdoba (27 cepas), luego Buenos Aires (22 cepas) y Santa fe (21 cepas); y en menor frecuencia en Entre Ríos (4 cepas) y San Juan (1 cepa).

Gráfico 5. Gráfico de columna agrupada donde muestra los serotipos distribuidos por provincias.



Las cepas positivas para el serotipo 1, fueron aisladas en distintas provincias como Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, San Juan y Santa Fe. En el caso del serotipo 4, 5 y 12, corresponden a aislamientos de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Mientras que el serotipos 7 solo se halló en cepas aisladas de Córdoba y en el caso del serotipo 13, solo fueron de Buenos Aires.

Gráfico 6. Gráfico de análisis de correspondencia múltiples de los serotipos vs. estación del año.



Se observó una significancia ($p=0.02$) en test de Fischer, asociando el aislamiento del serotipo 1 con el invierno y el serotipo 13 y 7 con primavera, a su vez la época de verano se asocia más con el serotipo 5/12 (Anexo).

Gráfico 7. Gráfico de columna agrupada donde muestra las frecuencias de los serotipos vs. años.

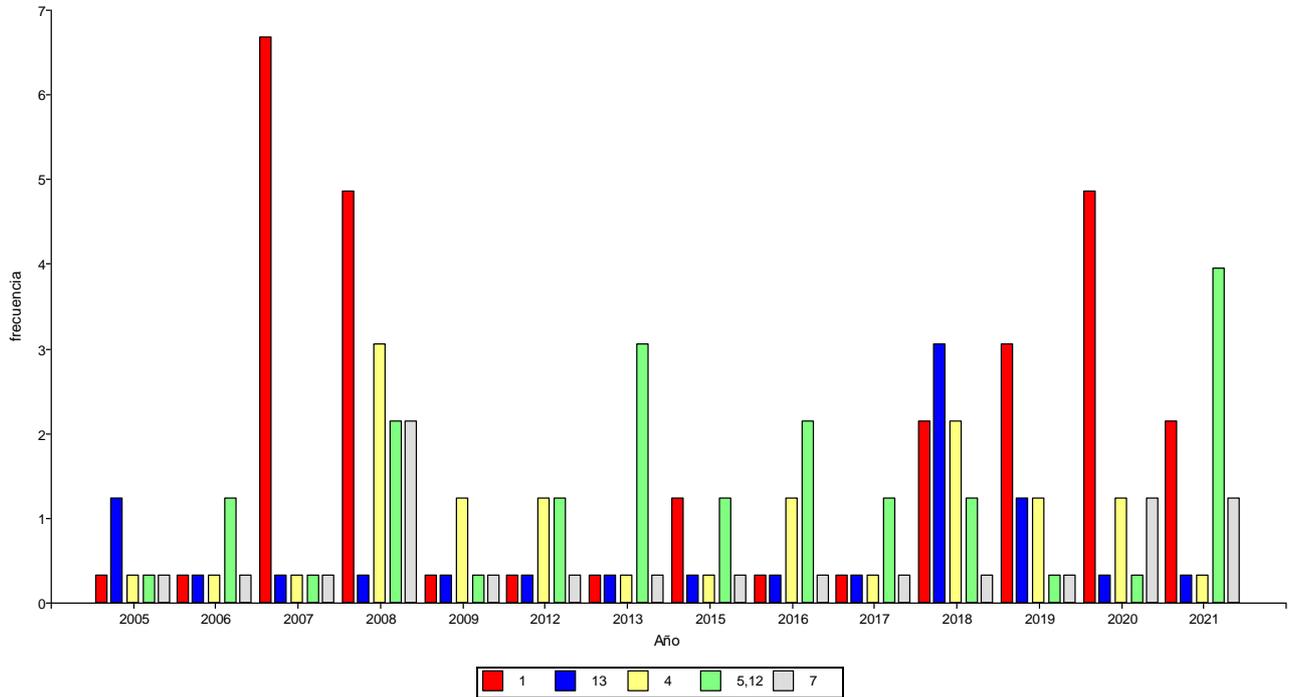
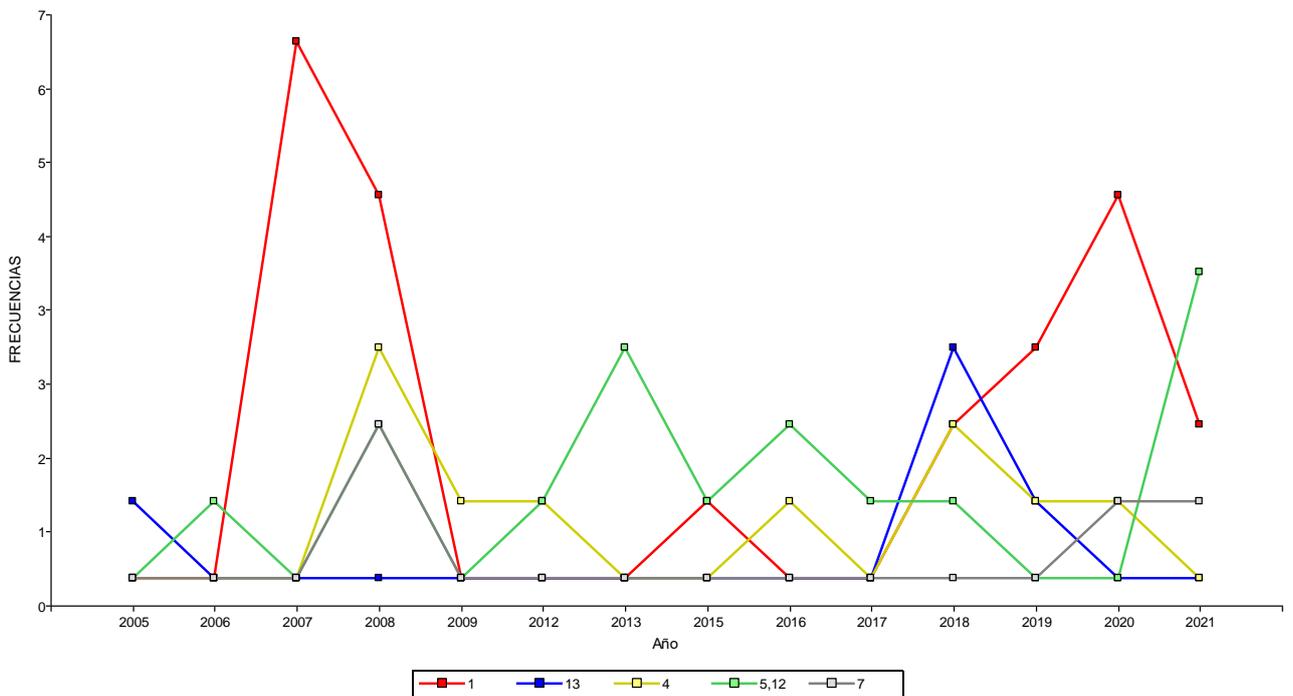
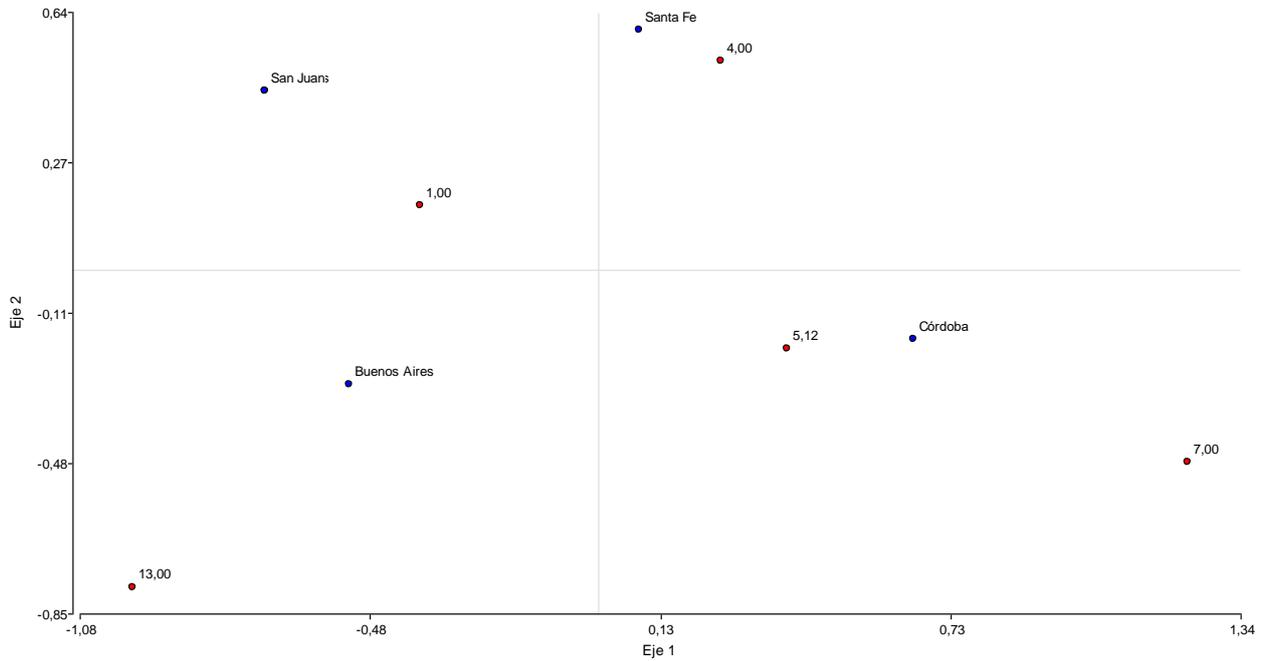


Gráfico 8. Gráfico de línea apilada con marcadores donde muestra las frecuencias de los serotipos vs. años.



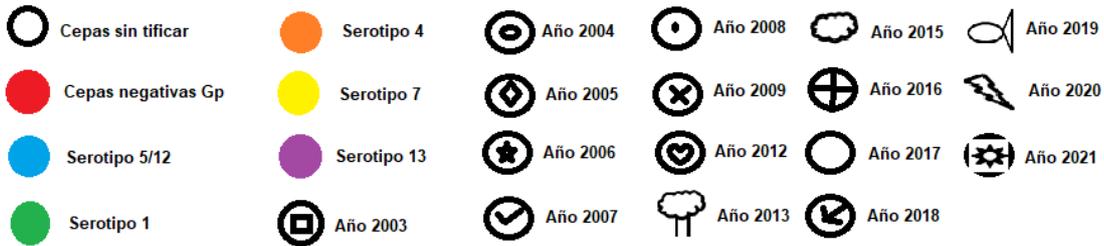
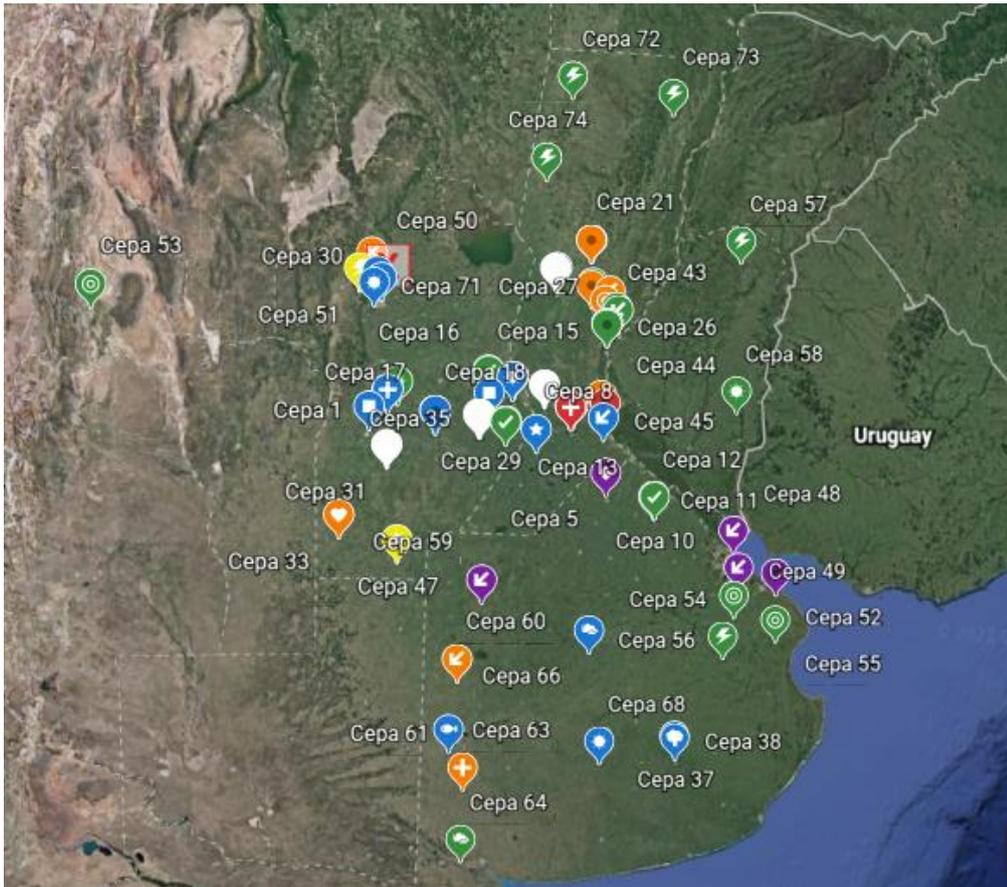
En el gráfico se puede observar, que en el correr de los años casi todos los serotipos se mantienen presentes y hay una variabilidad de ellos en el transcurso del tiempo (Anexo).

Gráfico 9. Gráfico de análisis de correspondencia múltiples de los serotipos vs. las provincias.



Se observó una significancia ($p=0,01$) en test de Fischer, asociando los aislamientos del serotipo 4 con la provincia de Santa Fe, los serotipos 5/12 y 7 con la provincia de Córdoba, el serotipo 13 con Buenos Aires y el serotipo 1 con la provincia de San Juan (Anexo).

Figura 4. Mapa con la distribución de los serotipos por años en Argentina.



En el mapa se puede apreciar la distribución de las cepas aisladas que corresponde con la región pampeada del país.

DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos podemos decir que de 67 de las 75 muestras dieron positivas para *G. parasuis*, es decir un 89,3%. Mientras que 8 de las muestras fueron negativas. Esto puede deberse a una confusión de diagnóstico dentro de las cepas fastidiosas, ya que desde la bioquímica bacteriológica su interpretación suele ser dificultosa (Gutierrez *et al.* 1993).

De las 67 positivas, solo quedaron 6 sin tipificar, eso se puede deber a la calidad del ADN o bien que hubo una variación a nivel de los serotipos y con los primers no pudo ser reconocido. En un futuro, se podría hacer una secuenciación de dichas muestras para evaluar lo antes mencionado o bien, descubrir un nuevo serotipo.

En estudios previos llevados a cabo en Argentina, los serotipos predominantes eran el 5, 4, 12 y 13, este último en menor frecuencia, como menciona López (2011). En este trabajo, contrariamente con esos resultados, los serotipos prevalentes son el 1,5 y 12, 4, 7 y 13. Esto significa que hubo un aumento de la variabilidad de los serotipos con el correr de los años.

Cabe señalar que en Argentina solo existen vacunas contra algunos de los serotipos. Las mismas, son importadas desde otros países, por lo tanto, no cubren todos los serotipos existentes en Argentina, resultando ineficaz en algunas granjas. Esto es así, ya que no existen las reacciones cruzadas inmunológicas entre serotipos. De allí la importancia de conocer el serotipo que infecta a cada granja, estudio que actualmente y salvo la remisión de los aislamientos al extranjero (Zielinski 2006), no se realiza en el país.

Comparado con otros países como Japón, Alemania, Estados Unidos, Canadá y Australia los serotipos prevalentes eran 5, 4 y 13 (Howell *et al.* 2015). Actualmente, aparecen dos nuevos serotipos, el 1 y 7, los demás serotipos coinciden con los otros países y se mantienen en el tiempo, es decir, que siguen siendo prevalentes o siguen apareciendo a pesar de los años.

De los serotipos encontrados, solo el 7 es un serotipo avirulento y es debido a esto que solo 4 cepas fueron avirulentas. El resto de las cepas (57) fueron virulentas.

En Argentina, está confirmada la presencia de *G. parasuis*, aunque no se han realizado exhaustivos estudios epidemiológicos para determinar su difusión (Zielinski 2006). A partir

de este trabajo, se observó distribución de las cepas y de los serotipos con respecto a las provincias de Argentina. Las cepas se aislaron predominantemente en Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, y en menos preponderancia en Entre Ríos y San Juan. Las cepas positivas para el serotipo 1, fueron aisladas en distintas provincias como Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, San Juan y Santa Fe. En el caso del serotipo 4, 5 y 12, las cepas fueron aisladas en Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Mientras que el serotipo 7 solo se halló en cepas aisladas de Córdoba y en el caso del serotipo 13, solo fueron de Buenos Aires.

En el país, es un descubrimiento que la mayoría de los aislamientos ocurren en otoño y primavera. Es decir que, la aparición de *G. parasuis* es mayoritariamente en el cambio de estación, y cuando las pjaras son más susceptibles al cambio climático. Gracias al test Fischer (Gráfico 6) se descubrió que las distintas estaciones de año se asocian más con un serotipo. Es decir los aislados del serotipo 1 se relaciona con el invierno y los del serotipo 13 y 7 con primavera y los del verano se asocia más con el serotipo 5/12.

Otro descubrimiento (Gráfico 7) fue encontrar asociaciones a largo plazo, es decir desde 2005 hasta el 2021 los serotipos encontrados se mantuvieron presentes en el país y fueron variando a lo largo del tiempo. Esto puede deberse a la comercialización porcina, es decir por el ingreso de nuevas variedades genéticas porcinas al país, haciendo que aumente la variabilidad de los serotipos y que aumente la frecuencia de ellos. Al no ser una enfermedad zoonótica ni de denuncia obligatoria por disposiciones nacionales, no se realizan los testeos y controles para detectar la presencia de *G. parasuis*.

En el gráfico 9 se asociaron los aislamientos del serotipo 4 con la provincia de Santa Fe, los serotipos 5/12 y 7 con la provincia de Córdoba, el serotipo 13 con Buenos Aires y el serotipo 1 con la provincia de San Juan. Estas asociaciones son una novedad ya que es un tema en crecimiento, lo que amplía el conocimiento que tenemos de *G. parasuis* y su distribución en el país. Este tema ya se estudió ampliamente en China, donde encontraron la distribución de la bacteria en el noreste, norte, este, centro, sur y suroeste de su país (Zhao *et al.* 2018) y también a lo largo de los años.

En base a la figura 4 en el mapa podemos visualizar que las cepas corresponden a la región pampeana de la Argentina. Dicha distribución ocurre porque es una zona donde hay mayor cantidad de granjas y donde ocurre la comercialización porcina (Brunori 2013).

CONCLUSIÓN

En este trabajo podemos concluir que:

- El 89,6% de las muestras fueron positivas para *G. parasuis*. Solo el 10,6% dieron negativas.
- Se encontraron 5 serotipos (1, 4, 5 y 12 ,7 y 13) en Argentina.
- De las cepas aisladas 57 fueron virulentas y 4 no, estas últimas corresponden a cepas positivas para el serotipo 7.
- Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe son las provincias con mayor cantidad de cepas aisladas.
- Se encontró que en los cambios de estación hay mayor cantidad de cepas aisladas. Los aislados del serotipo 1 se relaciona con el invierno y los del serotipo 13 y 7 con primavera y los del verano se asocia más con el serotipo 5/12.
- Se encontró asociación de los aislamientos del serotipo 4 con la provincia de Santa Fe, los serotipos 5/12 y 7 con la provincia de Córdoba, el serotipo 13 con Buenos Aires y el serotipo 1 con la provincia de San Juan.
- Las cepas aisladas tienen una distribución en la región pampeana del país.

Por último, la información obtenida sienta precedente para continuar haciendo diagnóstico de *G. parasuis*. También, se buscará en el futuro incorporar una vacuna autóctona que incluya serotipos circulantes de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiqing, J; Zhou, R; Huiying, F; Kaijie, Y; Jianmin, Z; Yindi, X; Guiping, W; Liao, M. 2017. Development of Serotype-Specific PCR Assays for Typing of *Haemophilus parasuis* Isolates Circulating in Southern China. *Journal of Clinical Microbiology* 55(11):3249-3257.
- Brunori, J. 2013. PRODUCCIÓN DE CERDOS EN ARGENTINA: SITUACIÓN, OPORTUNIDADES, DESAFÍOS (en línea). :3-5. Disponible en <http://inta.gov.ar/documentos/produccion-de-cerdos-en-argentina-situacion-opportunidades-desafios>.
- Cerdà-Cuéllar, M; Naranjo, JF; Verge, A; Cortey, M; Cerda, M; Aragon, V; Olvera, A; Segale, J. 2010. Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis*. :2-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.002>.
- Costa-hurtado, M; Aragon, V. 2013. Advances in the quest for virulence factors of *Haemophilus parasuis* (en línea). *The Veterinary Journal* 198(3):571-576. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.027>.
- Costa-Hurtado, M; Barba-Vidal, E; Maldonado, J; Aragon, V. 2020. Update on Glässer's disease: How to control the disease under restrictive use of antimicrobials. (en línea). *Veterinary Microbiology* :1-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108595>.
- Gutierrez, CB; Tascon, RI; Rodriguez Barbosa, JI; Gonzalez, OR; Vazquez, JA; Rodriguez Ferri, EF. 1993. Characterization of V factor-dependent organisms of the family Pasteurellaceae isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 16(2):123-130. DOI: [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(93\)90004-O](https://doi.org/10.1016/0147-9571(93)90004-O).
- Howell, KJ; Peters, SE; Wang, J; Hernandez-garcia, J; Weinert, LA; Luan, S; Chaudhuri, RR; Angen, Ø; Aragon, V; Williamson, SM; Parkhill, J; Langford, PR; Rycroft, AN; Wren, BW; Maskell, DJ; Tucker, AW; Consortium, B. 2015. Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*. *Journal of Clinical Microbiology* 53(12):3812-3821. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01991-15>.
- Huang, H; Tsai, C; Chang, J; Hsu, T; Lin, S; Lee, C. 2018. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection : systematic review and meta-analysis (en línea). *Clinical Microbiology and Infection* 24(10):1055-1063. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>.
- Lin, W; Shih, H; Lin, C; Yang, C; Lin, C; Chiou, M. 2019. Genotypic analyses and virulence characterization of *Glaesserella parasuis* isolates from Taiwan. :1-13. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.6960>.
- Liu, H; Xue, Q; Zeng, Q; Zhao, Z. 2016. *Haemophilus parasuis* vaccines (en línea). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 180:53-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.09.002>.
- Liu, S; Li, W; Wang, Y; Gu, C; Liu, X; Charreyre, C; Fan, S. 2017. Coinfection with *Haemophilus parasuis* serovar 4 increases the virulence of porcine circovirus type

2 in piglets. :1-9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0890-6>.

López-Ramírez, KL; Díaz-Maldonado, KC; Vergara Espinoza, MA; Santamaría-Veliz, O; Serquén-López, LM; Olinda, BC; León-Jimenez, FE; Aguilar-Gamboa, F-R. 2018. Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido , aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria . Hospital Regional Lambayeque, Perú. :11-18.

López, J V. 2011. Enfermedad de glässer. Aspectos prácticos. Sitio Argentino de Producción Animal (Tabla 1):1-9.

Olvera, A; Pina, S; Macedo, N; Oliveira, S; Aragon, V; Bensaid, A. 2012. Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA) (en línea). *Veterinary Journal* 191(2):213-218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.014>.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., RCW. s. f. InfoStat versión 2020 (en línea). . Disponible en <http://www.infostat.com.ar>.

SAS Institute Inc. 2020. SAS University edition virtual application. Cary, NC,.

Straw, BJ. 2000. Enfermedades del cerdo. 8 ed. D'Allaire, S; Mengeling, WL; Taylor, DJ (eds.). Buenos Aires, Republica Argentina, Inter-Médica. v. 1,522 p.

Talaat, A; Ali, R; Taha, M; Gabr, A; Mohamed, H. 2020. Prevalence of some virulence factors and genotyping of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from cancer patients (en línea). *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 23:211-216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.003>.

Wang, H; Liu, L; Cao, Q; Mao, W; Zhang, Y; Qu, X; Cai, X; Lv, Y; Chen, H; Xu, X; Wang, X. 2018. *Haemophilus parasuis* α -2,3-sialyltransferase- mediated lipooligosaccharide sialylation contributes to bacterial pathogenicity (en línea). *Virulence* 9(1):1247-1262. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1502606>.

Yue, C; Li, J; Jin, H; Hua, K; Zhou, W; Wang, Y. 2019. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting Invasion and Inflammation During High-Virulent *Haemophilus parasuis* Infection in PK-15 Cells. 9(April):1-14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00093>.

Zanolli Moreno, L; Salvavagni Castilla, K; Dirani Sena de Gobbi, D; AlenCoutinho, T; Porfida Ferrerira, TS; Moreno, AM. 2011. ERIC-PCR genotipic characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from brazilian swine. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:1420-1426.

Zeng, R; Jiao, Y; Torrents, D. 2013. Efficacy of one shot vaccination program against *Haemophilus parasuis* in nursery piglets. *APVS* .

Zhang, P; Zhang, C; Aragon, V; Zhou, X; Zou, M; Wu, C. 2019. Investigation of *Haemophilus parasuis* from healthy pigs in China (en línea). *Veterinary Microbiology* 231(December 2018):40-44. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.034>.

Zhao, Y; Wang, Q; Li, J; Lin, X; Huang, X. 2018. Epidemiology of *Haemophilus parasuis* isolates from pigs in China using serotyping , antimicrobial susceptibility , biofilm formation and ERIC-PCR genotyping. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.5040>.

Zielinski, G. 2006. ENFERMEDADES RE-EMERGENTES: INFECCIONES POR STREPTOCOCCUS SUIS Y HAEMOPHILUS PARASUIS. :1-6.

Zimmerman, JJ. 2012. Diseases of swine. 10 ed. Karriker, LA; Ramirez, A; Schwartz, KJ; Stevenson, GW (eds.). Iowa, Estados Unidos de América, Wiley-Blackwell. 1008 p.

ANEXO

Datos estadísticos:

Tabla de serotipo por estación					
serotipo	estación				
Frecuencia Esperada Pct fila	Invierno	Otoño	Primavera	Verano	Total
1,00	4 3.5294 26.67	7 5.2941 46.67	3 3.0882 20.00	1 3.0882 6.67	15
13,00	0 0.2353 0.00	0 0.3529 0.00	1 0.2059 100.00	0 0.2059 0.00	1
4,00	3 1.1765 60.00	1 1.7647 20.00	1 1.0294 20.00	0 1.0294 0.00	5
5,12	1 2.3529 10.00	4 3.5294 40.00	0 2.0588 0.00	5 2.0588 50.00	10
7,00	0 0.7059 0.00	0 1.0588 0.00	2 0.6176 66.67	1 0.6176 33.33	3
Total	8	12	7	7	34

Estadísticos para la tabla de serotipo por estación

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi-cuadrado	12	22.2687	0.0346
Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud	12	23.8927	0.0210
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	4.4247	0.0354
Coeficiente Phi		0.8093	
Coeficiente de contingencia		0.6291	
V de Cramer		0.4672	
WARNING: 95% de las celdas tienen una cantidad menor que 5. Puede que chi-cuadrado no sea un test válido.			

Test exacto de Fisher	
Tabla de probabilidad (P)	<.0001
Pr <= P	0.0211

Tamaño de la muestra = 34

Tabla de serotipo por provincia						
serotipo	provincia					
Frecuencia Esperada Pct fila	Buenos Aires	Córdoba	Entre Ríos	San Juan	Santa Fe	Total
1,00	10 9.0164 40.00	5 8.6066 20.00	4 1.6393 16.00	1 0.4098 4.00	5 5.3279 20.00	25
13,00	5 1.8033 100.00	0 1.7213 0.00	0 0.3279 0.00	0 0.082 0.00	0 1.0656 0.00	5
4,00	2 3.6066 20.00	3 3.4426 30.00	0 0.6557 0.00	0 0.1639 0.00	5 2.1311 50.00	10
5,12	5 6.1311 29.41	9 5.8525 52.94	0 1.1148 0.00	0 0.2787 0.00	3 3.623 17.65	17
7,00	0 1.4426 0.00	4 1.377 100.00	0 0.2623 0.00	0 0.0656 0.00	0 0.8525 0.00	4
Total	22	21	4	1	13	61

Estadísticos para la tabla de serotipo por provincia

Estadístico	DF	Valor	Prob
Chi-cuadrado	16	31.2268	0.0126
Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud	16	33.5726	0.0062
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	0.0100	0.9202
Coeficiente Phi		0.7155	
Coeficiente de contingencia		0.5819	
V de Cramer		0.3577	
WARNING: 80% de las celdas tienen una cantidad menor que 5. Puede que chi-cuadrado no sea un test válido.			

Test exacto de Fisher	
Tabla de probabilidad (P)	<.0001
Pr <= P	0.0140

Tamaño de la muestra = 61