

## Epidemiologia molecular de *Haemophilus parasuis*

### Molecular epidemiology of *Haemophilus parasuis*

Núbia Resende de Macêdo<sup>I</sup> Simone Rodrigues Oliveira<sup>II</sup> Andrey Pereira Lage<sup>III</sup>  
Roberto Maurício Carvalho Guedes<sup>I\*</sup>

### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

A maioria dos estudos epidemiológicos envolvendo *Haemophilus parasuis* isolados de rebanhos suínos brasileiros se baseia em sorotipagem. Entretanto, uma alta porcentagem de amostras não é sorotipável. Técnicas moleculares têm sido utilizadas com sucesso para caracterizar a diversidade dos isolados de *H. parasuis* e a epidemiologia das infecções por esse agente dentro e entre rebanhos. Esta revisão enfoca aspectos gerais da infecção por *H. parasuis*, principalmente em relação às técnicas de epidemiologia molecular.

**Palavras-chave:** suíno, *Haemophilus parasuis*, epidemiologia molecular.

#### ABSTRACT

The majority of epidemiological studies involving *Haemophilus parasuis* from Brazilian herds are based on serotyping. However, a high percentage of isolates are non-typable. Recently, molecular-based techniques were successfully used to characterize the diversity of *H. parasuis* isolates and the epidemiology of *H. parasuis* infections within and among herds. This review tackles general aspects of *H. parasuis* infection, mainly regarding to techniques of molecular epidemiology.

**Key words:** swine, *Haemophilus parasuis*, molecular epidemiology.

#### INTRODUÇÃO

Outrora considerada uma doença esporádica de suínos jovens submetidos a estresse, a polisserosite (doença de Glässer), causada pelo *H. parasuis*, tem emergido como uma importante doença bacteriana, afetando suínos em todo o mundo (RAPP-GABRIELSON, 1999). Inoculação intratraqueal em suínos não vacinados com amostra de *H. parasuis* altamente virulenta resultou em doença com as características de septicemia aguda, frequentemente seguida de morte rápida (MARTÍN DE LA FUENTE et al., 2009). Atualmente é considerada uma das doenças mais importantes economicamente na indústria de suínos devido aos altos custos com tratamentos antibióticos e ao descarte de animais (NEDBALCOVA et al., 2006). Em um estudo em que se verificou a prevalência de importantes patógenos bacterianos em 60 rebanhos suínos de Ontário, verificou-se a presença de *H. parasuis* em 58 deles (MacINNES et al, 2008).

O conhecimento da epidemiologia de *H. parasuis* dentro e entre rebanhos suínos é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle desse microrganismo. Recentemente, técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a epidemiologia molecular de diversos

<sup>I</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: guedes@vet.ufmg.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Veterinary Diagnostic Laboratory, University of Minnesota, Saint Paul, MN, USA.

<sup>III</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

patógenos bacterianos e com isso caracterizar a variabilidade genética de amostras envolvidas em mortalidade, definição de grupos de amostras prevalentes, e identificação da origem de amostras virulentas. Essas informações são cruciais para seleção de isolados destinados à produção de vacinas autógenas e prevenção de introdução de animais carreadores de amostras virulentas em rebanhos susceptíveis. Além disso, a genotipagem de *H. parasuis* permite o constante monitoramento de amostras envolvidas em novos casos clínicos e a atualização das amostras vacinais, quando necessário. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é discutir a Doença de Glässer, enfatizando a importância do estudo da epidemiologia molecular de *H. parasuis*.

## DESENVOLVIMENTO

### Sorotipos

Tradicionalmente, amostras de *H. parasuis* têm sido classificadas por sorotipagem. Embora esse método seja relativamente útil para caracterização de cepas e preparo de vacinas, não é discriminativo o bastante para epidemiologia (OLVERA et al., 2006a). Importante levar em consideração que é possível e normal isolar mais de um sorotipo do mesmo rebanho e até de um mesmo animal (SMART et al., 1988).

Sorotipagem pode ser realizada por difusão em gel de agar (MOROZUMI & NICOLET, 1986; KIELSTEIN & RAPP-GABRIELSON, 1992; SANTOS, 1997) ou hemaglutinação indireta (DEL RIO et al., 2003; TADJINE et al., 2004). Em ambos os casos, antígenos termoestáveis são caracterizados utilizando-se soro policlonal específico para cada sorotipo. A ocorrência de isolados de *H. parasuis* não sorotipáveis tem sido comum, variando de 15,2% (RAPP-GABRIELSON & GABRIELSON, 1992) a 41% (RAFIEE & BLACKALL, 2000).

Atualmente, são conhecidos 15 sorotipos (1-15) de *H. parasuis* por meio do teste de imunodifusão (KIELSTEIN & RAPP-GABRIELSON, 1992). O sorotipo 4 (39%) e os isolados não sorotipáveis (27%) foram os mais prevalentes nos rebanhos norte-americanos (OLIVEIRA et al., 2003). No Brasil, os 15 sorotipos já foram identificados e, entre 321 amostras de *H. parasuis* isolados de suínos oriundos de 204 propriedades, os sorotipos mais prevalentes foram 1, 4, 5 e 12 (representando 47% dos isolados), e 8,7% das amostras foram não sorotipáveis (SANTOS, 1997).

Os fatores de virulência de *H. parasuis* ainda não estão bem definidos. A classificação desse microrganismo em um sorotipo específico já foi considerada como um indicador de virulência. No

entanto, atualmente, diferenças entre amostras com base em características fenotípicas e genotípicas têm sido relatadas (OLIVEIRA & PIJOAN, 2004b; RAPP-GABRIELSON et al., 2006). Além disso, diversos estudos confirmaram que amostras diferentes de *H. parasuis* têm capacidade patogênica diferente (KIELSTEIN & RAPP-GABRIELSON, 1992; NIELSEN, 1993). Outros estudos têm sido realizados para se comprovar a associação entre a expressão de fatores de patogenicidade e virulência em infecções por *H. parasuis* (JIN et al., 2008; DEL RÍO et al., 2006a; METCALF & MacINNES, 2007), embora nenhuma associação evidente com virulência pôde ser determinada. O desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais específicas, tais como a detecção de genes específicos para virulência, permitirá a identificação precisa de amostras virulentas.

A identificação do sorotipo é um dos critérios essenciais nos programas imunoprofiláticos baseados em vacinas autógenas. Entretanto, é necessário considerar que mais de um sorotipo pode estar presente no rebanho e, com isso, a amostra isolada para produzir a bacterina pode não ser aquela envolvida no desenvolvimento da doença. Além disso, mais de um sorotipo patogênico pode estar envolvido no surto, a correlação entre sorotipo e virulência não é evidente, e a proteção cruzada entre diferentes sorotipos e mesmo entre amostras de mesmo sorotipo é variável e difícil de prever (RAPP-GABRIELSON et al., 1997; OLIVEIRA & PIJOAN, 2002; SANTOS & SOBESTIANSKY, 2007). Há ainda uma significativa porcentagem de isolados que não são sorotipáveis, mas que podem estar causando doença no rebanho (RAPP-GABRIELSON et al., 1997). Isso torna fundamental a diferenciação de isolados de *H. parasuis* na estratégia de produção de uma vacina autógena.

### Epidemiologia

O *H. parasuis* está amplamente distribuído no mundo. No Brasil, por não ter sido ainda bem estudado, desconhece-se a extensão da sua ocorrência nos rebanhos. É um dos primeiros agentes a colonizar o aparelho respiratório superior de suínos sadios de granjas convencionais, e a imunidade natural desempenha importante papel para evitar que a bactéria invada os tecidos e cause doença (SANTOS & SOBESTIANSKY, 2007). Sendo assim, a adequada diferenciação de amostras comensais e amostras virulentas é extremamente importante no diagnóstico e controle de *H. parasuis* (OLVERA et al., 2007a).

### Epidemiologia molecular

Técnicas de biologia molecular têm se tornado bastante integradas na prática da

epidemiologia de doenças infecciosas para caracterizar de forma precisa as amostras de organismos. Epidemiologia molecular é o uso de técnicas de biologia molecular no estudo dos determinantes da ocorrência da doença e de sua distribuição em populações. Técnicas moleculares não substituem os métodos convencionais. Elas são direcionadas a questões que não são resolvidas ou então que seriam mais trabalhosas, caras e/ou mais demoradas de serem solucionadas se fossem utilizadas técnicas convencionais (FOXMAN & RILEY, 2001).

Atualmente, métodos de genotipagem são utilizados para caracterizar isolados de *H. parasuis* e estudar a epidemiologia das infecções dentro e entre rebanhos. Esses métodos podem ser utilizados para definir amostras prevalentes que afetam rebanhos suínos e para diferenciar esses isolados em amostras comensais e amostras virulentas, selecionando, assim, isolados representativos para serem utilizados em vacinas autógenas (OLIVEIRA & PIJOAN, 2002; OLIVERA et al., 2007a).

A maioria dos estudos epidemiológicos sobre infecções por *H. parasuis* se baseia em sorotipagem (MORIKOSHI et al., 1990; KIELSTEIN & RAPP-GABRIELSON, 1992; RAPP-GABRIELSON & GABRIELSON, 1992; BLACKALL et al., 1996; SANTOS, 1997; RUBIES et al., 1999; RAFIEE & BLACKALL, 2000). Entretanto, a correlação entre sorotipo e virulência não é evidente, e a proteção cruzada entre diferentes sorotipos e mesmo entre amostras de mesmo sorotipo é variável e difícil de prever (RAPP-GABRIELSON et al., 1997). Sorotipagem não fornece adequada discriminação de isolados para estudos epidemiológicos, além disso, entre 15-41% dos isolados não são tipáveis por esse método (OLIVEIRA et al., 2003). Dessa forma, métodos moleculares têm sido utilizados para superar as limitações da sorotipagem em estudos epidemiológicos de infecções por *H. parasuis* (OLIVEIRA & PIJOAN, 2004a). Esses testes permitem melhor caracterização dos isolados quando comparados com sorotipagem, e já foi sugerido que certos perfis de DNA podem estar associados com virulência (OLIVEIRA et al., 2003). As técnicas moleculares também apresentam maior precisão para monitorar a distribuição, a prevalência e o surgimento de novos isolados altamente virulentos nos rebanhos suínos, sendo, portanto essenciais atualmente para a sanidade suína, principalmente para identificar amostras a serem incluídas nas vacinas. Serão discutidas a seguir algumas técnicas de genotipagem utilizadas em epidemiologia molecular de *H. parasuis*.

#### *Restriction endonuclease fingerprinting (REF)*

Consiste na digestão de DNA genômico puro com endonucleases de restrição e subsequente análise dos fragmentos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. SMART et al. (1988) foram os primeiros pesquisadores a utilizar um método de genotipagem para estudar a ocorrência e distribuição de amostras de *H. parasuis*.

*Restriction endonuclease fingerprinting (REF)* já havia sido anteriormente utilizada com sucesso para diferenciar amostras de outras espécies bacterianas que não podiam ser classificadas por meio de sorotipagem, como *Campylobacter* sp. e *Brucella* sp. (O'HARA et al., 1985; COLLINS & ROSS, 1988). SMART et al. (1988) utilizaram tipagem por REF para identificar diferentes amostras de *H. parasuis* isoladas de rebanhos suínos convencionais e SPF, em Ontário, no Canadá. Não houve compartilhamento de amostras entre os rebanhos convencionais e SPF, e os rebanhos convencionais apresentaram uma população mais heterogênea de amostras de *H. parasuis* quando comparados com rebanhos SPF. Além disso, em determinado rebanho, muitas amostras de *H. parasuis* puderam ser isoladas, mas, na maioria dos casos, uma ou duas amostras predominavam. Interessante ressaltar também que os perfis REF de amostras do trato respiratório superior foram diferentes dos perfis das amostras isoladas de locais fora do sistema respiratório, o que poderia sugerir que este último grupo representasse as amostras patogênicas.

Tipagem por REF também foi utilizada para detectar falha vacinal em surtos da doença de Glässer. Isolados obtidos da cavidade nasal de animais saudáveis e isolados obtidos de casos clínicos da doença foram diferentes daqueles presentes em bacterinas comerciais utilizadas nos rebanhos (SMART et al., 1993). Essa investigação indicou que isolados de *H. parasuis* da cavidade nasal são diferentes daqueles que causam doença clínica e que nem toda amostra de bacterina é protetora para as outras amostras existentes. Apesar de ser um método com alto poder discriminativo, a sua interpretação é extremamente complicada.

#### *Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)*

MLEE foi utilizada anteriormente para verificar a diversidade genética entre outros patógenos bacterianos, tais como *Streptococcus suis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (HAMPSON et al., 1993; TROTT et al., 1993; WOODWARD et al., 1993). Essa técnica consiste na diferenciação de isolados bacterianos de acordo com a variação na mobilidade de enzimas bacterianas durante a corrida de eletroforese.

Os perfis de bandas para um determinado número de enzimas são considerados *electrophoretic types* (ET) e refletem o genótipo cromossomal da bactéria, estimando, dessa forma, a relação genética entre as amostras (BOERLIN & PIFFARETTI, 1991). BLACKALL et al. (1997) utilizaram esse mesmo método para determinar a relação entre si de 40 isolados australianos de *H. parasuis* e entre estas e oito das 15 amostras referência. Os resultados revelaram a existência de duas subdivisões distintas dentre as 40 amostras de *H. parasuis* isoladas na Austrália, o que está de acordo com o trabalho de DEWHIRST et al. (1992). Amostras isoladas de locais fora do trato respiratório estavam presentes em ambos os grupos, não havendo uma correlação evidente entre a virulência e as duas maiores divisões. Além disso, foi grande a diversidade entre os isolados, até mesmo entre isolados de mesmo sorotipo, o que deixou claro para os autores que o sorotipo não é um bom indicador epidemiológico para *H. parasuis* (BLACKALL et al., 1997).

#### *Restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP)

A técnica de PCR-RFLP envolve a amplificação de um gene pelo método de PCR e a digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição para obter um perfil de bandas. A principal vantagem é que, se o PCR for específico, elimina-se a necessidade do isolamento bacteriano, e a técnica pode ser realizada diretamente de amostras clínicas (DE LA PUENTE REDONDO et al., 2000).

DE LA PUENTE REDONDO et al. (2000) evidenciaram que a amplificação do gene *tbpA* pode ser uma ferramenta útil para caracterizar espécies de patógenos suínos da família *Pasteurellaceae*. Dessa forma, DE LA PUENTE REDONDO et al. (2003) desenvolveram um teste de PCR-RFLP baseado no gene *tbpA* para tipificar *H. parasuis*, utilizando as 15 amostras de referência e 101 isolados de casos clínicos de *H. parasuis*, sendo 90 da Espanha e 11 dos EUA e do Canadá. Dentre as amostras de referência, foram obtidos apenas 12 perfis, e os sorotipos 5, 12, 14 e 15 foram iguais entre si. Já os isolados de casos clínicos foram divididos em 33 perfis, o que indicou uma alta diversidade genética entre isolados de *H. parasuis*, assim como ausência de relação fixa entre sorotipagem e perfis RFLP. Segundo esses autores, este é um importante achado epidemiológico devido ao fato de os surtos da doença de Glässer serem comumente causados por mais de um isolado. Entretanto, no estudo de DEL RÍO et al. (2006b), algumas das amostras de referência de *H. parasuis* testadas compartilharam perfis RFLP com isolados de *A. pleuropneumoniae*.

Embora ainda a causa desse achado não seja conhecida, uma possível explicação para esse fato seria a ocorrência de transferência lateral de gene.

#### *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

OLVERA et al. (2006a), utilizando um método de 'single-locus sequence typing' pelo sequenciamento parcial do gene *hsp60*, também verificaram uma alta heterogeneidade entre as amostras de *H. parasuis* analisadas. Porém, apesar de ter sido detectado um grupo de isolados virulentos, a classificação das amostras não foi satisfatória. Dessa forma, OLVERA et al. (2006b) desenvolveram um método 'multilocus sequence typing' (MLST) para *H. parasuis*.

A técnica de MLST envolve o sequenciamento de fragmentos de 450-600pb de genes específicos e a designação de perfis de alelos, que resultam em tipos de sequências (ST) (OLVERA et al., 2006b). A técnica de MLST tem sido utilizada com sucesso para a determinação de "complexos clonais" (CC) de vários patógenos humanos e animais (COOPER & FEIL, 2004). OLVERA et al. (2006b) analisaram 11 das 15 amostras de referência e 120 amostras de campo por meio do método MLST. Já que a sequência genômica de *H. parasuis* não está disponível, foram utilizados iniciadores delineados para *H. influenzae* e iniciadores universais.

Como era esperado, a diversidade média *per locus* no esquema MLST foi maior (0,777) que aquela relatada pelo método *multilocus enzyme electrophoresis* (0,405) (BLACKALL et al., 1997). De acordo com outros autores (SMART et al., 1988; RAFIEE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003; OLVERA et al., 2006a), os resultados de OLVERA et al. (2006b) confirmam que várias amostras (entre uma e cinco) podem circular em uma granja. Além disso, diferentes amostras podem ser isoladas do mesmo animal, até mesmo da mesma lesão sistêmica, o que indica que mais de uma amostra pode estar envolvida em um surto da doença.

Foi possível identificar dois grupos patogênicamente diferentes. Um dos grupos estava associado com isolados da cavidade nasal e provavelmente formado por amostras não virulentas. Já os isolados de locais não respiratórios estavam presentes em outro grupo. Entretanto, não foi possível estabelecer relação confiável entre esse achado e a possível virulência de alguns isolados de *H. parasuis* (OLVERA et al., 2006b). A heterogeneidade genética de *H. parasuis*, segundo o método MLST, foi extremamente alta, já que as 120 amostras foram divididas em 109 tipos, e amostras únicas

representando um grupo foram bastante frequentes (OLVERA et al., 2006b).

OLVERA et al. (2007b) estudaram como um surto da Doença de Glässer seguida por um tratamento antimicrobiano afeta a população de *H. parasuis*. Utilizando dois testes de genotipagem MLST e ERIC-PCR, verificaram que as amostras isoladas após o tratamento antimicrobiano possuíam o mesmo perfil genético, sendo, portanto, uma única amostra que resistiu ao tratamento. Além disso, durante o surto, realizaram isolamento bacteriano de suabes nasais e lesões de animais com polisserosite e, em seguida, fizeram sorotipagem e genotipagem (MLST e ERIC-PCR) dessas amostras. A amostra de *H. parasuis* isolada de lesões foi agrupada com outras amostras virulentas no banco de dados, tanto pelo teste MLST, quanto por sorotipagem. Já os isolados de suabes nasais foram incluídos no mesmo grupo pelo MLST e ERIC-PCR, mas apresentaram alta variabilidade de sorotipos, o que, segundo os autores, torna a sorotipagem uma técnica instável. Em relação às técnicas de genotipagem, os autores concluíram que, para a identificação de diferentes clones em uma propriedade, ERIC-PCR é mais rápido e mais barato que MLST. Entretanto, MLST fornece informações adicionais, desde que também permita a comparação de isolados em uma determinada propriedade com outros isolados epidemiologicamente não relacionados.

#### *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR)*

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

selecionar isolados para serem usados em vacinas autógenas. É uma importante ferramenta para pesquisa, prevenção e controle da infecção por *H. parasuis* (OLIVEIRA, 2007).

As sequências ERIC estão distribuídas aleatoriamente pelo genoma bacteriano. Essas sequências foram, inicialmente, identificadas em espécies de *Salmonella* e *Escherichia coli* e, por isso, receberam o nome de *enterobacteriaceae* (SHARPLES & LLOYD, 1990). Posteriormente, descobriu-se que elas eram altamente conservadas entre as diferentes espécies bacterianas. Várias cópias de elementos ERIC, compartilhando a mesma sequência de DNA, podem ser encontradas em um determinado genoma bacteriano, sendo, por isso, conhecidos como elementos “repetitivos”. Elementos ERIC são regiões não codificadoras localizadas entre genes, isto é, em posições intergênicas. Esses elementos contêm repetições centrais invertidas altamente conservadas, que são conhecidas como “consensos”. Essas posições no genoma de um determinado isolado bacteriano parecem ser conservadas em amostras relacionadas. Amostras diferentes possuem distribuição diferente dos elementos ERIC em seus genomas. A amplificação por meio de PCR de regiões genômicas entre cópias ERIC produz um perfil de fragmentos distintos em um gel de agarose. Esses fragmentos geram uma identidade (*fingerprint*) genômica, que pode ser utilizada para identificar amostras relacionadas (VERSALOVIC et al., 1991; OLIVEIRA, 2007). A função dessas sequências repetitivas de DNA em genomas de mamíferos permanece desconhecida (VERSALOVIC et al., 1991).

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

#### CONCLUSÃO

*Haemophilus parasuis* tem sido um desafio para a sanidade suína. Várias medidas de controle têm sido propostas, sendo a vacina autógena considerada a mais segura e, em muitos casos, a mais eficiente. As técnicas moleculares representam um grande avanço no estudo da epidemiologia de *H. parasuis*, pois permitem uma identificação mais precisa de cada isolado quando comparadas à sorotipagem. É necessário considerar as características epidemiológicas de cada

surto da doença associadas a uma técnica adequada segundo sua capacidade de discriminação entre as amostras para agrupar amostras aparentemente diferentes. Mais estudos são necessários para melhor compreensão da patogênese e identificação dos fatores de virulência de *H. parasuis*, que, associadas a técnicas moleculares, fornecerão as informações necessárias para o desenvolvimento de vacinas novas e efetivas.

## REFERÊNCIAS

- BLACKALL, P.J. et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. **Australian Veterinary Journal**, v.73, n. 3, p.93-95, 1996.
- BLACKALL, P.J. et al. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v.56, n.1-2, p.125-134, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01342-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01342-9)>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/S0378-1135(96)01342-9.
- BOERLIN, P.; PIFFARETTI, J. Typing of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.6, p.1624-1629, 1991.
- COLLINS, D.M.; ROSS, D.E. Restriction endonuclease analysis of *Campylobacter* strains with particular reference to *Campylobacter fetus* ss. *fetus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.18, n.1, p.117-124, 1988.
- COOPER, J.E.; FEIL, E.J. Multilocus sequence typing – what is resolved? **Trends Microbiology**, v.12, n.8, p.373-377, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.003>>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1016/j.tim.2004.06.003.
- DE LA PUENTE REDONDO et al. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* e *tbpB* genes. **Research Microbiology**, v.151, n.8, p.669-681, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00135-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00135-2)>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/S0923-2508(00)00135-2.
- DE LA PUENTE REDONDO, V.A. et al. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. **Veterinary Microbiology**, v.92, n. 8, p. 253-262, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00362-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00362-0)>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/S0378-1135(02)00362-0.
- DEL RÍO, M.L. et al. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.880-882, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.880-882.2003>>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1128/JCM.41.2.880-882.2003.
- DEL RÍO, M.L. et al. Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the FhuA receptor. **Veterinary Research**, v.37, n.1, p.49-59, 2006a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2005039>>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1051/vetres:2005039.
- DEL RÍO, M.L. et al. *aro A* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. **Research in Veterinary Science**, v.80, n.1, p.55-61, 2006b. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.
- DEWHIRST, F.E. et al. Phylogeny of 54 representative strains in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. **Journal Bacteriology**, v.174, n.6, p.2002-2013, 1992.
- FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: Focus on infection. **American Journal Epidemiology**, v.153, n.12, p.1135-1141, 2001.
- HAMPSON, D.J. et al. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.11, p.2895-2900, 1993.
- JIN, H. et al. Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS). **Environmental Microbiology**, v.10, n.12, p.3323-3336, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01729.x>>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01729.x.
- KIELSTEIN, P.; RAPP-GABRIELSON, V.J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. **Journal Clinical Microbiology**, v.30, n.4, p.862-865, 1992.
- MacINNES, J.I. et al. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.72, n.3, p.242-248, 2008.
- MARTIN DE LA FUENTE, A.J. et al. Effect of different vaccine formulations on the development of Glässer's disease induced in pigs by experimental *Haemophilus parasuis* infection. **Journal of Comparative Pathology**, v.1, n.1, p.1-8, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.10.007>>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/j.jcpa.2008.10.007.
- METCALF, D.S.; MacINNES, J.I. Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, n.1, p.181-188, 2007.
- MORIKOSHI, T. et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan. **Japanese Journal Veterinary Science**, v.56, n.3, p.667-669, 1990.
- MOROZUMI, T.; NICOLET, J. Some properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. **Journal Clinical Microbiology**, v.23, n.6, p.1022-1025, 1986.
- NEDBALCOVA, K. et al. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. **Veterinary Medicine**, v.51, n.5, p.168-179, 2006.
- NIELSEN, R. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.34, n.2, p.193-198, 1993.

- O'HARA, M.J. et al. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. **Veterinary Microbiology**, v.45, n.5, p.384-389, 1985.
- OLIVEIRA, S. *Haemophilus parasuis* diagnostics. **Journal Swine Health Production**, v.15, n.2, p. 99-103, 2007.
- OLIVEIRA, S. et al. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by serotyping and genotyping. **American Journal Veterinary Research**, v.64, n.4, p.435-442, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.435>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.435.
- OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. **Journal Swine Health Production**, v.10, n.5, p.221-225, 2002.
- OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Review article. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.1, p.1-12, 2004a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.12.001>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 0.1016/j.vetmic.2003.12.001.
- OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.68, n.1, p.71-75, 2004b.
- OLVERA, A. et al. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, n.6, p. 3984-3992, 2006a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.435>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.2460/ajvr.2003.64.435.
- OLVERA, A. et al. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. **Microbiology**, v. 152, n.12, p. 3683-3690, 2006b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.29254-0>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1099/mic.0.29254-0.
- OLVERA, A. et al. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods. **Veterinary Journal**, v.174, n.3, p.522-529, 2007a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.017>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/j.tvjl.2006.10.017.
- OLVERA A. et al. Dynamics of *Haemophilus parasuis* genotypes in a farm recovered from an outbreak of Glässer's disease. **Veterinary Microbiology**, v.123, n.1-3, p.230-7, 2007b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.004>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2007.03.004.
- RAFIEE, M. et al. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, v.78, n.12, p.846-849, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb10507.x>. Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1111/j.1751-0813.2000.tb10507.x.
- RAFIEE, M., BLACKAL, P.J. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. **Australian Veterinary Journal**, v.78, n.3, p.172-174, 2000.
- RAPP-GABRIELSON, V.J.; GABRIELSON, D. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. **American Journal Veterinary Research**, v.53, n.5, p.659-664, 1992.
- RAPP-GABRIELSON, V.J. et al. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination. **Veterinary Medicine**, v.92, n.1, p.83-90, 1997.
- RAPP-GABRIELSON, V.J. *Haemophilus parasuis*. In: STRAW B.E. et al. **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State, 1999. p.475-481.
- RAPP-GABRIELSON, V.J. et al. *Haemophilus parasuis*. In: STRAW B.E. et al. **Diseases of swine**. Ames, IA: Iowa State, 2006. p.681-690.
- RUBIES, X. et al. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. **Veterinary Microbiology**, v.66, n.3, p.245-248, 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00007-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00007-3). Acesso em: 10 maio 2009. doi:10.1016/S0378-1135(99)00007-3.
- RUIZ, A. et al. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. **Journal Clinical Microbiology** v.39, n.5, p.1757-1762, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5.1757-1762.2001>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1128/JCM.39.5.1757-1762.2001.
- SANTOS, J.L. **Epidemiologia e controle da infecção por *Haemophilus parasuis***. 1997. 69f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- SANTOS, J.L.; SOBESTIANSKY, J. Doença de Glässer. In: SOBESTIANSKY, J. et al. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p.89-93.
- SHARPLES, G.J.; LLOYD, R.G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6503, 1990.
- SMART, N.L. et al. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.52, n.3, p. 319-324, 1988.
- SMART, N.L. et al. An investigation of enzootic Glässer's disease in a specific pathogen-free grower-finisher facility using endonuclease analysis. **Canadian Veterinary Journal**, v.34, n.3, p.487-490, 1993.
- TADJINE, M. et al. Development of a serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. **Journal Clinical Microbiology**, v.24, n.2, p.839-840, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.2.839-840.2004>. Acesso em: 10 maio 2009. doi: 10.1128/JCM.42.2.839-840.2004.
- TROTT, D.J. et al. Genetic characterization of isolates of *Listeria monocytogenes* from man, animals and food. **Journal of Medical Microbiology**, v.38, n.2, p.122-128, 1993.
- VERSALOVIC, J. et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.
- WOODWARD, J.M. et al. Clonal analysis of *Escherichia coli* of serogroups O9, O20, and O101 isolated from Australia pigs with neonatal diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.5, p.1185-1188, 1993.