

VANESSA ANNY SOUZA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE *Avibacterium paragallinarum* EM FRANGOS
DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

Recife

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

VANESSA ANNY SOUZA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE *Avibacterium paragallinarum* EM FRANGOS
DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof^o Dr^o Leonildo Bento Galiza da Silva.

Recife

2013

Ficha catalográfica

S586i Silva, Vanessa Anny Souza
Identificação de *Avibacterium paragallinarum* em frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco / Vanessa Anny Souza Silva. – Recife, 2013.
49 f.

Orientador: Leonildo Bento Galiza da Silva.
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2013.
Inclui referências e anexo(s).

1. Coriza infecciosa 2. PCR 3. Isolamento I. Silva, Leonildo Bento Galiza da, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO DE *Avibacterium paragallinarum* EM FRANGOS
DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

Dissertação de mestrado elaborada por

VANESSA ANNY SOUZA SILVA

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Leonildo Bento Galiza da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profº Drº Rinaldo Aparecido Mota

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profª Drª Mércia Rodrigues Barros

Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Drª Sineide Maria de Oliveira Vilela

LADA-Laboratório de Diagnóstico Animal

Aos meus familiares, em especial a Dona Gigi, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me mostra que as provações e dificuldades são acompanhadas de benefícios incomparáveis, e que as coisas dão certo de maneira tão magnífica, que nem parecem que um dia foram insuportáveis.

Ao professor Rinaldo, por todo o conhecimento que me foi permitido graças ao senhor, e também pelo exemplo de humildade e paciência, uma pessoa que realmente deixa todos inspirados.

Ao professor Leonildo, pelos conselhos, puxões de orelha, pelas dicas, pela paciência, pela dedicação, muito obrigada, sempre vai ser pouco, mas sempre farei questão de agradecer ao senhor e ao Professor Rinaldo.

A professora Mércia, pelo socorro nas horas de desespero, você foi fundamental!

A professora Sineide, pela disponibilidade.

Aos amigos e colegas do Laboratório, em especial Pomy Kim, são sempre tão fofos, como sempre digo as minhas amigas residentes, esse é o melhor ambiente de trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários dos programas de pós-graduação da UFRPE, que possibilitam a existencia e produtividade dos mesmos.

Agradecimento ao Dr. Raul Terzolo do Instituto Nacional De Tecnologia Agropecuária da Argentina.

A minha família, pois a cada dia fico mais ciente que não seria nada sem vocês, que as perdas dos nossos entes queridos sejam convertidos em mais olhares no céu acompanhando nossos passos.

Aos meus pais, que são inspiração pra que eu e meus irmãos, nunca deixemos de procurar sermos pessoas melhores, pois eles são pessoas incríveis, minha mãe com sua energia vital e meu pai com seu amor incondicional, em especial pelos animais, que me inspira sempre. Conseguiram de maneira especial, construir uma mega família, mega perfeita, que eu mega amo.

Aos meus amigos, que são muitas vezes, meus amores, meus pais, meus terapeutas, meus mecânicos, meus orientadores, minhas faxineiras, meus motoristas, meus cozinheiros, veterinários de Juno, vocês sabem que “Quando nós lutamos pelos nossos

amigos, os nossos poderes se multiplicam, foi isso que eu aprendi naquela época...”.
Stephania (em especial), Daniela (minha cumadre), Priscilla, Joyci, Carolina, Raissa, Acidália, Gabriela, Camilinha, Sandro, Fernanda, Betão, Renan, Renata, Tamine, Túlia, Ju, Monique, Celícia, sempre lutarei por vocês, independente dos nossos caminhos, vocês são importantes pra mim.

A Juno, que renova todos os dias o meu amor pelos animais. Com seu amor incondicional... Aos meus amigos, mas tudo bem, eu a amo apesar disso, ela é minha companhia de todas, todas, todas as horas.

Aos animais, que fazem parte da minha vida e da minha missão.

Aos meus avós Gigi e Nado, que não podem me acompanhar neste momento, mas que sabem e entendem tudo que esta acontecendo, do paraíso.

Pode ser um gato, um pássaro, um furão ou um porquinho da índia, mas há grandes chances de um animal preencher a lacuna deixada pela morte de um ente querido. Animais devoram a solidão. Dão propósito, responsabilidade, uma razão para levantar da cama de manhã.

Dr. Nick Trout, Diga trinta e três.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE *Avibacterium paragallinarum* EM FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

As aves de produção são suscetíveis a surtos de doenças infecciosas acarretando desta forma perdas econômicas para indústria avícola, principalmente por enfermidades infecciosas causadas por *Mycoplasma* sp., *Avibacterium paragallinarum* e vírus que acometem o trato respiratório. *A. paragallinarum* é um importante patógeno que causa a coriza infecciosa (CI) aviária. Para o diagnóstico de CI é necessário o histórico, o isolamento da bactéria e em seguida uma caracterização bioquímica, outra técnica utilizada é a reação em cadeia de polimerase (PCR) para a identificação precisa do patógeno. Objetivou-se neste estudo pesquisar o envolvimento do *A. paragallinarum* em surto de doença respiratória aviária. Foram coletados 18 suabes da região infraorbitária dos seios nasais de aves, sendo 6 amostras de frangos de corte com sinais clínicos e 12 de poedeiras com sinais clínicos. As amostras foram cultivadas em meios específicos para o agente e também testadas com a técnica molecular Reação em Cadeia de Polimerase. Das amostras analisadas no isolamento, 100% foram negativas. Na PCR, duas (16,66%) foram positivas. A detecção de *A. paragallinarum* na PCR em galinhas poedeiras com sinais clínicos respiratórios indica que esta bactéria está associada à etiologia da síndrome respiratória das aves nas granjas no estado de Pernambuco.

Palavras chave: Coriza infecciosa, PCR, isolamento.

ABSTRACT

Avibacterium paragallinarum IDENTIFICATION IN BROILER AND COMMERCIAL LAYING IN THE STATE OF PERNAMBUCO

The Brazilian poultry industry is susceptible to infectious disease outbreaks related to economic losses, mainly for infectious diseases caused by *Mycoplasma*, *Avibacterium paragallinarum* and viruses affecting the respiratory tract. *A. paragallinarum* is an important pathogen that causes avian infectious coryza. For diagnostic history CI is necessary, isolation of bacteria and then a suspected biochemical, another possibility is the polymerase chain reaction (PCR) for the accurate identification of the agent. The objective of this study researching the involvement of *A. paragallinarum* in avian respiratory disease outbreak. We collected 18 swabs of intranasal content of birds, of which 6 samples of chickens with clinical signs and 12 hens with clinical signs. Samples were grown in specific media for the agent also tested with the molecular technique of Polymerase Chain Reaction. Of the samples analyzed in isolation, 100% were negative. PCR in only two (16,66%) were positive. The detection of *A. paragallinarum* PCR in laying hens with clinical signs respiratory indicates that this bacterium is associated with the etiology of respiratory syndrome in poultry farms in the state of Pernambuco.

Key-words: Infectious coryza, PCR, isolation.

LISTA DAS ABREVIATURAS

A. – *Avibacterium*

BHI - Infusão de cérebro e coração

CI – Coriza Infecciosa

DNA - Ácido desoxirribonucleico

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo

H. - *Haemophilus*

HI - Inibição da hemaglutinação

PCR – Reação em cadeia de polimerase

UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Coriza Infecciosa	14
2.2. <i>Avibacterium [Haemophilus] paragallinarum</i>	14
2.3. Antigenicidade.....	15
2.4. Fatores de Virulência	16
2.5. Patogenicidade.....	16
2.6. Epidemiologia	16
2.7. Transmissão	17
2.8. Importância Econômica	18
2.9. Morbidade e Mortalidade	18
2.10. Sinais Clínicos	18
2.11. Lesões	19
2.12. Tratamento	20
2.13. Imunidade	21
2.14. Vacina	21
2.15. Diagnóstico	22
2.16. Isolamento e Identificação	23
2.17. Técnicas Moleculares	25
REFERÊNCIAS	26
3. ARTIGO CIENTÍFICO	35
IDENTIFICAÇÃO DE <i>Avibacterium paragallinarum</i> EM FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO	

1. INTRODUÇÃO

A avicultura no Brasil é uma das atividades que mais tem se desenvolvido. Este progresso possibilitou à indústria avícola, notável potencial para prover aos consumidores fontes proteicas saudáveis à custo baixo (FILHO et al., 2003). Isso se deve, basicamente, à busca de novos sistemas de criação, que objetivam a maior produtividade no menor tempo possível (LANA et al., 2001). A indústria avícola brasileira é propícia a surtos de doenças infecciosas relacionadas a perdas econômicas (DROUAL et al., 1990). O impacto econômico causado pelas enfermidades das aves domésticas advém principalmente de doenças infecciosas causadas por *Mycoplasma* sp., *Avibacterium paragallinarum* e vírus que acometem o trato respiratório (MOUAHID et al., 1992). Dentre estas se destaca a coriza infecciosa (CI) que é uma doença respiratória aguda que acomete o trato respiratório superior de galinhas, causada pela bactéria *Avibacterium paragallinarum* que foi reconhecida pela primeira vez apenas no final dos anos 1920 (BEACH, 1920; DROUAL et al., 1990; YAMAMOTO, 1991).

A CI pode estar presente onde houver criação de galinha, todavia ocorre principalmente em granjas que possuem aves de múltiplas idades e é influenciada por fatores ambientais como o clima, a superpopulação, a virulência da bactéria, a ocorrência de afecções concorrentes que complicam a infecção (SANDOVAL et al., 1994). Essa patologia desencadeia prejuízos econômicos, advindos do menor desempenho de crescimento e uma redução acentuada (10-40%) em produção de ovos (BLACKALL e MATSUMOTO, 2003).

Os sinais clínicos mais comuns são secreção nasal, conjuntivite e inchaço dos seios nasais e face, podendo desenvolver diarreia, diminuição no consumo de ração e água, retardando o crescimento em aves jovens e reduzindo a produção de ovos em granjas de poedeiras. O envolvimento do trato respiratório inferior pode ser devido ao sinergismo entre *A. paragallinarum* e outros patógenos respiratórios (BLACKALL, 1989).

O curso da doença tende a ser maior em aves adultas, especialmente em galinhas no período de produção de ovos. A CI tem um curto período de incubação se desenvolvendo dentro de 24-48 horas após a inoculação em galinhas com cultura pura ou exsudato infeccioso (RIMLER, 1979). Aves suscetíveis expostas por contato com

aves infectadas podem apresentar sinais da doença dentro de 24-72 horas. Na ausência de um concorrente para a infecção, CI geralmente segue seu curso dentro de duas a três semanas (BLACKALL e MATSUMOTO, 2003).

A CI deve ser diferenciada de outras doenças, tais como doença respiratória crônica, cólera aviária crônica, boubá aviária, ornithobacterioses, síndrome da cabeça inchada e avitaminose, que podem produzir sinais clínicos semelhantes. Como as infecções de *A. paragallinarum* muitas vezes ocorrem com infecções mistas, deve-se considerar a possibilidade de outras bactérias ou vírus estarem presentes complicando a CI, principalmente se a mortalidade é elevada e quando a doença tem um curso prolongado (BLACKALL e MATSUMOTO, 2003).

No nível mais simples a CI pode ser diagnosticada com base na história de uma doença que se espalha rapidamente na qual a coriza é a principal manifestação, além dos outros sinais clínicos já descritos anteriormente, todavia, devido a vasta possibilidades de agentes envolvidos, faz-se necessário o estudo aprofundado, através de técnicas laboratoriais afim de se ter um diagnóstico definitivo (SMIDT, 2001).

Existem várias complicações para o isolamento e identificação de *A. paragallinarum*, requerendo meios complexos e aditivos para o crescimento, sendo um organismo de crescimento relativamente lento *in vitro*, o que significa que outros organismos podem crescer mais rapidamente e mascarar a presença de *A. paragallinarum* (BLACKALL e YAMAMOTO, 1990). O diagnóstico é realizado com base nos sinais clínicos, em conjunto com a realização de exames microbiológicos e a reação em cadeia de polimerase (PCR) para a identificação precisa do agente, possibilitando a terapêutica mais adequada do caso e estabelecimento de programas de biossegurança mais eficientes (CHEN et al., 1996; SALMON e WATTS, 2000).

O estudo da CI é relevante pelas perdas econômicas provocadas pela doença, devido à importância desta enfermidade nos plantéis avícolas. Objetivou-se neste estudo pesquisar o envolvimento do *A. paragallinarum* em surto de doença respiratória aviária no estado de Pernambuco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Coriza Infecciosa

2.1.1. Histórico

Avibacterium paragallinarum causa doença respiratória aguda nas galinhas conhecida como coriza infecciosa (CI). Esta doença foi reconhecida pela primeira vez apenas em 1920 (BEACH, 1920), devido à dificuldade no isolamento da bactéria, que complicou sua identificação por vários anos, pois a doença era frequentemente mascarada devido a infecções mistas como a bouba aviária (SMIDT, 2001). De Blicek (1932) isolou o agente causador e nomeou-o *Bacillus hemoglobinophilus coryzae gallinarum*.

O gênero *Haemophilus* foi criado para bactérias que se desenvolvem na presença de hemoglobina, assim, a proposta independente de Elliot e Lewis (1934) e Delaphane et al. (1934), do nome "*Haemophilus gallinarum*" para o agente causador da CI foi prontamente aceito, por requisitar como fatores de crescimento o X (hemina) e V (nicotinamida adenina dinucleotídeo - NAD) (ELLIOT e LEWIS, 1934; SCHALM e BEACH, 1936). Page (1962a) realizou uma série de isolamentos de *Haemophilus* de casos de CI e descobriu que nenhum exigia o fator X para o crescimento, mas todos necessitavam de NAD, levando a proposta e aceitação geral de uma nova espécie, *H. paragallinarum*, para organismos que requerem apenas NAD para o crescimento (YAMAMOTO, 1991).

Como resultado de testes da natureza genotípica e fenotípica foi proposta a transferência de *Haemophilus paragallinarum* para um novo gênero o *Avibacterium paragallinarum* (BLACKALL et al., 2005).

2.2. *Avibacterium paragallinarum*

2.2.1. Morfologia

A. paragallinarum é uma bactéria gram negativa, com coloração polar ou bipolar, não móvel. Em 24 horas de cultura, surgem como bastonetes curtos ou cocobacilos com 1-3µm de comprimento e 0,4-0,8µm de largura, com tendência para a formação de filamento. Uma cápsula pode ser demonstrada em estirpes virulentas (HINZ, 1976; SAWATA et al., 1980). O microrganismo sofre degeneração dentro 48 a 60 horas, mostrando fragmentos e formas indefinidas (YAMAMOTO, 1991).

As colônias não são hemolíticas, se apresentam como pequenas gotas de orvalho de até 0,3 mm de diâmetro. Em luz transmitida obliquamente apresenta-se mucóide (liso) iridescente, não abrasivo e outras formas intermédias de colônias podem ser observadas (HINZ, 1973; RIMLER, 1979; SAWATA et al., 1979; SAWATA e KUME, 1983).

2.2.2. Classificação

Devido a exigência de NAD por todos os isolados recuperados no mundo desde 1962, alguns pesquisadores foram levados a questionar a validade de testes utilizados pelos trabalhos anteriores na classificação dos isolados de *A. gallinarum* (RIMLER, 1979). De fato, tem sido sugerido que as descrições iniciais do agente causador da CI como um organismo dependente de fator X e fator V estão incorretos (BLACKALL e YAMAMOTO, 1989).

2.2.3. *Avibacterium paragallinarum* NAD-independentes ou dependentes

A. paragallinarum NAD-independentes foram isolados em frangos de corte na África do Sul (MOUAHID et al., 1992). Horner et al. (1992) também relataram o isolamento de microrganismos NAD-independentes a partir de galinhas apresentando sinais clínicos típicos de CI em Natal, África do Sul. Estudo realizado por Bragg et al. (1993) corrobora com estudos de Mouahid et al. (1992), que identificaram isolados de *A. paragallinarum* NAD-independentes na África do Sul, por meio de hibridação

DNA/DNA, e contra argumenta a sugestão de Horner et al. (1992), que os isolados NAD-independentes, feitos a partir de galinhas com sinais clínicos de CI não podem ser classificados como *A. paragallinarum* baseado puramente na independência de NAD.

O argumento baseou-se no trabalho de Gromkova e Koornhof (1990), que relataram NAD-independentes em quatro organismos bioquimicamente indistinguível de *H. parainfluenza*, exceto pelo fato de que eles eram capazes de crescimento sem NAD. Como tal, eles não podem ser classificados como *H. parainfluenza* de acordo com os critérios da taxonomia atual. Posteriormente, foi estabelecida por Windsor et al. (1991), que esses isolados carregavam um pequeno plasmídeo de 5,25 kb, que em caso de perda ou remoção, renderiam aos isolados NAD dependência. Podendo, portanto, concluir-se a partir desse trabalho que *H. parainfluenza* é capaz de adquirir um plasmídeo pequeno, tornando-se NAD-independente. Estes isolados devem, no entanto, ainda serem classificados como *A. parainfluenza*, mesmo ocorrendo naturalmente a NAD independência. Com base nos estudos da *H. parainfluenza* de Gromkova e Koornhof (1990), um extrato bruto de DNA de *A. paragallinarum* NAD-independente foi utilizado para transformar isolados NAD-dependentes em NAD-independente, sugerindo que os genes que conferem a independência estavam localizado num plasmídeo, de forma análoga ao localizado no plasmídeo *H. parainfluenza* (BRAGG et al., 1993).

2.3. Antigenicidade

Page (1962a) classificou seus isolados de *A. paragallinarum* com o teste de aglutinação em placas utilizando células inteiras e anti-soros de galinha em sorovares A, B e C. É possível utilizar um teste de inibição da hemaglutinação (HI) aos sorotipos isolados pelo esquema da Page (BLACKALL et al., 1990b). Um outro método de atribuição de isolados de *A. paragallinarum* a um sorovar Page baseia-se na utilização de um painel de anticorpos monoclonais desenvolvidos por pesquisadores no Japão (BLACKALL et al., 1991), mas a técnica está disponível apenas em alguns laboratórios devido à limitada disponibilidade dos anticorpos monoclonais.

Outros métodos descritos por Hinz (1980) reconheceu seis sorovares e Kume et al. (1983) reconheceu três sorogrupos e sete sorovares, propondo também uma

classificação sorológica alternativa com base no teste de HI. A terminologia de Kume foi alterada de modo que os sorogrupos Kume coincidissem com os sorovares Page de A, B, e C. Assim, existem atualmente nove sorotipos Kume reconhecidos, e são: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 e C-4 (BLACKALL et al., 1990b).

2.4. Fatores de Virulência

Informações sobre os fatores associados com a virulência de *A. paragallinarum* é limitado, mas sabe-se que uma série de fatores parecem estar envolvidos. Sawata et al. (1979) sugeriram que os antígenos L e HA - L (antígeno hemaglutinante), localizados no exterior da membrana foram responsáveis pela aderência à superfície da mucosa sinusal. Sawata et al. (1982) propuseram igualmente que a cápsula de ácido hialurônico pode ser a estrutura primária associada a fixação, em vez dos antígenos L e HA - L.

Kume et al. (1980) mostraram que o fator de virulência pode ser dissociado do fator de proteção. A cápsula também tem sido associada com a colonização e tem sido sugerida como sendo um fator importante nas lesões associado a CI (SAWATA e KUME, 1983; SAWATA et al., 1985). Variantes que possuem tanto o material capsular e antígeno L causam coriza e induzem imunidade; aqueles que não possuem uma cápsula mas possuem o antígeno L não foram patogênicos e eram imunogênico e aqueles que não possuem a cápsula e antígeno L foram patogênicas e não de proteção (SMIDT, 2001).

2.5. Patogenicidade

A patogenicidade de *A. paragallinarum* varia de acordo com as condições de crescimento do agente e o estado do hospedeiro (YAMAGUCHI et al., 1990). Horner et al. (1995) sugeriram que os isolados NAD-independentes podem causar aerossaculite mais frequente do que o isolado clássico de *A. paragallinarum* NAD-dependente.

2.6. Epidemiologia

2.6.1. Incidência e Distribuição

A CI pode estar presente onde houver criação de galinhas, sendo um problema comum na indústria intensiva de produção de frangos de corte e poedeiras comerciais, problemas significativos foram relatados na Califórnia, no sudeste dos Estados Unidos e mais recentemente nas regiões do nordeste dos Estados Unidos. Como exemplo, a CI tem sido um problema em Kampung na Indonésia (POERNOMO et al., 2000). Há trabalhos que relatam a infecção em diversos países do mundo (MOUAHID et al., 1992) como Brasil (BLACKALL et al., 1994), China (CHEN et al., 1998 B), Peru (MENDOZA-ESPINOZA et al., 2008), Uganda (BYARUGABA et al., 2006).

2.6.2. Hospedeiros Naturais e Experimentais

As aves de produção são os hospedeiros natural para *A. paragallinarum* (ZAINI e KANAMEDA, 1991), as seguintes espécies são refratárias à infecção experimental: peru, pombo, pardal, pato, corvo, guiné, coelho, porco e cobaia (YAMAMOTO, 1972 e 1978). E, galinhas de todas as idades são suscetíveis (YAMAMOTO, 1991), sendo geralmente mais branda em aves jovens.

2.7. Transmissão

Aparentemente a CI ocorre com mais frequência no outono e inverno, embora tais padrões sazonais possam coincidir com as práticas de manejo das granjas, como por exemplo, a introdução de frangas (aves) de reposição suscetíveis em granjas onde a CI ocorre comumente neste período. Em granjas onde aves de múltiplas idades são alojados, ocorre a propagação da doença para grupos aves suscetíveis, normalmente ocorrendo dentro de uma a seis semanas após as aves serem transferidas de galpões onde são criadas no chão, para gaiolas de crescimento e que estejam próximas de aves infectadas (CLARK e GODFREY, 1961).

Estudos epidemiológicos sugeriram que o agente pode ser introduzido em criações avícolas isoladas através da rota aérea (YAMAMOTO e CLARK, 1966). Aves portadoras crônicas têm sido reconhecidas como o principal reservatório da infecção. A aplicação das técnicas de caracterização molecular confirmou o papel de aves portadoras crônicas na propagação da CI (BLACKALL et al., 1990a).

2.8. Importância Econômica

Na indústria avícola a CI tem um importante efeito econômico no sul da África. Embora a doença seja limitada e não ter importância para a saúde pública, um aumento na taxa de descarte de frangos de corte, uma redução na produção de ovos (10-40%) em poedeiras e galinhas reprodutoras resultam em perdas financeiras para os criadores (YAMAMOTO, 1991).

2.9. Morbidade e Mortalidade

A CI é caracterizada por baixa mortalidade e morbidade (BLACKALL, 1983). Fatores como condições precárias de alojamento, parasitismo e inadequada nutrição podem agravar e aumentar o curso da doença. Quando complicada por outras doenças, como boubá aviária, bronquite infecciosa, laringotraqueíte, infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e pasteurelose, a CI é geralmente mais grave e prolongada, com o consequente aumento de mortalidade (SANDOVAL et al., 1994; YAMAMOTO, 1972).

2.10. Sinais clínicos

Os sinais clínicos mais comuns são secreção nasal, conjuntivite e inchaço dos seios nasais e face, podendo desenvolver diarreia, diminuição no consumo de ração e água retardando o crescimento em jovens e reduzindo a produção de ovos em granjas de poedeiras. O envolvimento do trato respiratório inferior pode ser devido ao sinergismo entre *A. paragallinarum* e outros patógenos respiratórios (BLACKALL, 1989).

A síndrome da cabeça inchada associada a *A. paragallinarum* tem sido relatada em frangos de corte na ausência de pneumovirose aviária, mas na presença ou ausência de outros agentes patogênicos bacterianos, tais como *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma Synoviae* (DROUAL et al., 1990; SANDOVAL et al., 1994). Artrite e septicemia foram relatados em frangos de corte e frangos de produção, respectivamente, em que a presença de outros agentes patogênicos estavam complicando a infecção (SANDOVAL et al., 1994).

O curso da doença tende a ser maior em aves adultas, especialmente em galinhas no período de produção de ovos. A CI tem um curto período de incubação se desenvolvendo dentro de 24-48 horas após a inoculação em galinhas com qualquer cultura ou exsudato (RIMLER, 1979). Aves suscetíveis expostas por contato com animais infectados podem apresentar sinais da doença dentro de 24-72 horas. Na ausência de um patógeno concorrente para a infecção, a CI geralmente segue seu curso dentro de duas a três semanas (BLACKALL e MATSUMOTO, 2003).

2.11. Lesões

2.11.1. Macroscópicas

A. paragallinarum produz uma inflamação catarral aguda nas membranas mucosas das passagens nasais e seios infraorbitais, conjuntivite catarral e edema subcutâneo da face e dos seios nasais, e raramente, pneumonia e aerossaculite estão presentes. Relatos de surtos em aves com aero saculite indicaram significativos níveis de condenações (até 69,8%), mesmo na ausência de quaisquer outros patógenos virais ou bacterianos reconhecidos (DROUAL et al., 1990; HOERR et al., 1994).

2.11.2. Microscópicas

A resposta histopatológica de galinhas com duas horas a três meses após a inoculação intranasal apresentam mudanças essenciais na cavidade nasal, seios infraorbitais e traquéia, consistindo de descamação, desintegração, hiperplasia da mucosa e epitélio glandular, edema e hiperemia com infiltração de heterófilos na própria túnica das membranas da mucosa. As primeiras alterações patológicas observadas são por volta de vinte horas chegando a severidade máxima em sete a dez dias, e posterior reparação ocorrendo dentro de 14 a 21 dias (FUJIWARA e KONNO, 1965). Nas aves com envolvimento do trato respiratório inferior pode ser encontrado broncopneumonia catarral aguda com heterófilos e detritos celulares que enchem o lúmen dos brônquios secundários e terciários. As células epiteliais dos capilares aéreos podem apresentar inchaço e hiperplasia. Inflamação catarral dos sacos aéreos é caracterizado por inchaço e hiperplasia das células, com infiltração abundante de

heterófilos. Além disso, um acentuado infiltrado de mastócitos pode estar presente na lâmina própria da membrana da mucosa da cavidade nasal (SAWATA et al., 1985). Os produtos dos mastócitos, heterófilos e macrófagos podem ser responsáveis pelas graves alterações e danos vasculares levando à coriza (SAWATA et al., 1985; DROUAL et al., 1990).

2.12. Tratamento

Vários antibióticos são úteis para aliviar a gravidade e o curso da CI, no entanto, nenhum dos agentes terapêuticos tem sido encontrado para ser bactericida. Recidivas frequentes ocorrem quando o tratamento é interrompido e o estado de portador não é eliminado (YAMAMOTO, 1991).

Sulfaclorpiridazina (DELAPHANE et al., 1934), sulfadimetoxina e clortetraciclina mais sulfadimetoxina (KATO, 1967) foram quimioterapeuticamente ativas contra CI em frangos de corte. Estreptomicina (BORNSTEIN e SAMBERG, 1955) também tem sido considerada eficaz no tratamento da CI contra um número de estirpes resistentes. Tiocianato de eritromicina (fórmula para aves) promoveu diminuição dos sinais clínicos em um número significativo de aves infectadas (PAGE, 1962b). Combinações de estreptomicina, espectinomicina e eritromicina não podem conter a infecção, mas há uma melhora acentuada do número de aves clinicamente afetadas (HANLEY et al., 1968). Buys (1972) mostrou que sulfaclorpiridazina, sulfadime e sulfato de dihidroestreptomicina podem ser usados com bons resultados para neutralizar os mais graves sinais clínicos da CI. Nenhum dos compostos utilizados pode curar todas as aves infectadas, mas as perdas econômicas podem ser diminuídas.

2.13. Imunidade

Aves de produção que se recuperaram de uma infecção ativa possuem diferentes graus de imunidade a reexposição. Aves que tiveram CI durante seu período de crescimento são geralmente resistentes a queda na produção de ovos no período de postura. A resistência individual à reexposição entre aves pode se desenvolver mais

cedo ou com duas semanas após a exposição inicial pela via intrasinus (SATO e SHIFRINE, 1964).

Frangos de corte infectados experimentalmente desenvolvem uma imunidade cruzada entre os sorovares (Esquema de Page) (RIMLER e DAVIS, 1977). Em contraste, bacterinas fornecem apenas imunidade sorovar-específica (KUME et al., 1980; BLACKALL e REID, 1987), sugerindo que a proteção cruzada de antígenos são expressos *in vivo* e que não são expressos ou são expressos em níveis muito baixos, *in vitro*.

Os antígenos protetores de *A. paragallinarum* não foram definitivamente identificados e tem sido sugerido que a cápsula de *A. paragallinarum* contém antígenos protetores (SAWATA et al., 1984). Estudo utilizando extrato bruto de polissacarídeo de cepas sorotipo Page A e C demonstrou que fornece proteção sorovar-específica (IRITANI et al., 1981).

2.14. Vacina

As aves podem ser vacinadas com até vinte semanas de idade, por via subcutânea ou intramuscular, depois de vinte semanas estas aves não podem ser revacinadas e a proteção conferida pela vacinação diminui com o aumento da idade das aves, e a imunidade significativa foi demonstrada durante cerca de nove meses após a vacinação (BLACKALL e REID, 1987, BLACKALL e MATSUMOTO, 2003). Atualmente as bacterinas comerciais são preparadas a partir de embriões de galinha ou caldo de carne, podem ser ou não autógenas e conter estirpes de dois a três diferentes sorotipos, sendo consideradas bivalentes e trivalentes, respectivamente. Os produtos são inativados com formalina ou mertiolato e devem conter pelo menos 10^8 UFC/ml para serem eficazes. Eles podem conter adjuvantes, estabilizantes ou diluentes salinos (SMIDT, 2001).

Falhas vacinais podem ocorrer devido a problemas quanto à proteção cruzada entre sorotipos (RIMLER et al., 1977; KUME et al., 1980). Outras dificuldades com o uso de vacinas contra CI devem-se ao fato de serem inativadas e a impossibilidade da manipulação de aves em produção, pois resulta em queda na produção de ovos, podendo ser maior do que quando influenciada pela própria doença. Além do fato da necessidade

do uso de adjuvantes, pois embora os efeitos negativos sejam mínimos, eles não podem ser completamente evitados.

Uma possibilidade é o desenvolvimento de uma vacina viva contra a CI, que tem como vantagem significativa a possibilidade de ser administrada às aves através da água de beber ou por pulverização, não sendo necessária a manipulação das aves ao longo da vida produtiva, melhorando consideravelmente os níveis de proteção e perdas econômicas (BLACKALL e REID, 1987).

2.15. Diagnóstico

2.15.1. Diagnóstico Diferencial

No nível mais simples a CI pode ser diagnosticada com base na história de uma doença que se espalha rapidamente na qual coriza é a principal manifestação, além dos outros sinais clínicos já descritos anteriormente, todavia, devido a vasta possibilidades de agentes envolvidos, faz-se necessário o estudo aprofundado, através de técnicas laboratoriais afim de se ter um diagnóstico definitivo (SMIDT, 2001).

A CI deve ser diferenciada de outras doenças, tais como doença respiratória crônica, cólera aviária crônica, boubá aviária, ornitobacterioses, síndrome da cabeça inchada e avitaminose, que podem produzir sinais clínicos semelhantes. Como as infecções de *A. paragallinarum* muitas vezes ocorrem com infecções mistas, deve-se considerar a possibilidade de outras bactérias ou vírus estarem presentes complicando a CI, principalmente se a mortalidade é elevada e quando a doença tem um curso prolongado (BLACKALL e MATSUMOTO, 2003).

2.16. Isolamento e Identificação

As amostras devem ser coletadas a partir de duas ou três galinhas na fase aguda da doença, com um a sete dias de incubação. A pele sob os olhos deve ser cauterizada com uma espátula de ferro quente e uma incisão é realizada para dentro da cavidade do seio infraorbital com tesoura estéril, inserindo suabes profundamente na cavidade do seio nasal, onde o microrganismo é mais frequentemente encontrado na forma pura.

Exsudado traqueal e sacos aéreos também podem ser coletados com o auxílio de suabes estéreis (SMIDT, 2001).

A forma reduzida de NAD (NADH) (1.56-25µg/ml média) ou sua forma oxidada (NAD⁺) e cloreto de sódio (NaCl) (1-1,5%), são essenciais para o crescimento *in vitro* de *A. paragallinarum* (RIMLER et al., 1977). Soro de Galinha (1%) é requerido por algumas estirpes. Infusão de cérebro e coração (BHI), ágar triptose e infusão de carne de frango são alguns meios básicos para os quais são adicionados suplementos. O pH destes meios varia entre 6,9-7,6. Outras fontes de NAD incluem gema de embriões de galinha o extrato de levedura fresca e soro de frango ou carneiro (YAMAMOTO, 1991). O microrganismo pode ser mantido em placas de ágar sangue por passagens semanais. Culturas jovens mantidas em microaerofilia permanecem viáveis durante duas semanas a 4°C. Um número de espécies de bactérias excretam NAD e têm sido usadas como culturas "feeder" para suportar o crescimento de *A. paragallinarum* (PAGE, 1962a), *Staphylococcus epidermidis* (BLACKALL e FARRAH, 1985) ou *S. hyicus* (BLACKALL e REID, 1982), são normalmente utilizados como "alimentadores", mas devem ser pré-testados, pois nem todas as estirpes produzem ativamente o factor V. Discos comerciais de fatores de crescimento utilizados para este fim podem proporcionar uma elevada percentagem de culturas que falsamente parecem ser tanto dependente factor X e V (BLACKALL e FARRAH, 1985). Em laboratórios bem equipados, o teste da porfirina (KILIAN, 1974) é recomendado para testes do fator X. Para testes clássicos de fator X e V, a utilização da hemina purificada e NAD como suplementos para complementar o meio pode ser considerado também.

A. paragallinarum geralmente é cultivado numa atmosfera de dióxido de carbono, no entanto, não é uma exigência essencial, uma vez que o micro-organismo é capaz de crescer sob tensão de oxigênio reduzido ou anaerobicamente (ELLIOT e LEWIS, 1934; PAGE, 1962a). As temperaturas mínima e máxima de crescimento são 25 e 45°C, respectivamente, sendo o intervalo ótimo entre 34-42°C, crescendo geralmente a 37-38°C. Os isolados devem apresentar colônias dewdrop (gota de orvalho) pequenas de até 0,3 milímetros de diâmetro. À luz transmitida obliquamente, mucóide (liso) iridescente e áspera não iridescente e outras formas de colônias intermediárias podem ser observadas (PAGE et al., 1963).

A capacidade para reduzir o nitrato a nitrito e fermentar a glucose sem a formação de gás é comum a todos os *Avibacterium* aviários. A atividade de oxidase,

presença da enzima fosfatase alcalina e uma incapacidade para produzir indol ou hidrólise de ureia ou de gelatina são também características uniformes (BLACKALL, 1989).

Estudos recentes têm utilizado um meio constituído de um caldo de vermelho de fenol contendo 1% (v/v) de NaCl, 25 ng/mL de NADH, 1% (v/v) de soro de galinha e 1% (v/v) de hidrato de carbono. Para a identificação de rotina, o uso do caldo de vermelho de fenol e um denso inoculo é a abordagem mais adequada para a determinação de padrões de fermentação de hidratos de carbono, e alternativamente, métodos em ágar podem ser usados (BLACKALL, 1983; TERZOLO et al., 1993).

As características principais que diferencia o *A. paragallinarum* NAD-independente do NAD-dependente são de que a primeira não tem atividade β -galactosidase e não fermenta a maltose (MOUAHID et al., 1992).

Existem várias complicações para o isolamento e identificação de *A. paragallinarum*, requerendo meios complexos e aditivos para o crescimento, sendo um organismo de crescimento relativamente lento *in vitro*, o que significa que outros organismos podem crescer demais e mascarar a presença de *A. paragallinarum* (BLACKALL e YAMAMOTO, 1990).

2.17. Técnicas moleculares

A decodificação do DNA por análise de restrição de endonuclease parece ser uma técnica adequada com padrões estáveis *in vitro* e *in vivo*, e tem mostrado utilidade em estudos epidemiológicos (BLACKALL et al., 1990 A, 1991). A ribotipagem permitiu analisar a relação epidemiológica entre os isolados de *A. paragallinarum* pesquisados na China (MIFLIN et al., 1997). A PCR é uma técnica utilizada na identificação de DNA e tem sido demonstrada sua capacidade na tipagem de estirpes (KHAN et al., 1998). A técnica de multilocus enzyme electrophoresis tem sido usada para examinar a diversidade genética de isolados de *A. paragallinarum* (BOWLES et al., 1993).

2.17.1. PCR

A identificação de *A. paragallinarum* foi feita por Chen et al. (1996) com o desenho dos iniciadores de PCR que asseguram a amplificação de um fragmento de DNA de 500pb quando *A. paragallinarum* é utilizado como molde. A PCR foi consistentemente negativa com todos os organismos intimamente relacionados, tornando este um método ideal de identificação, sendo possível ser realizado em poucas horas Chen et al. (1998b).

Um teste específico de PCR para *A. paragallinarum* tem sido desenvolvido, sendo um teste rápido com resultados disponíveis dentro de seis horas em comparação com as técnicas convencionais e foi capaz de detectar todos os isolados de *A. paragallinarum* testados, incluindo o *A. paragallinarum* NAD-independente da África do Sul e dos isolados sorovar variante Page A e do incomum sorotipo Page B isolados na Argentina. A PCR, denominada PCR HP-2, tem sido validada para uso provenientes de colônias em agar ou muco, obtido a partir do seio nasal de aves vivas (CHEN et al., 1996).

Quando usado diretamente de suabes de seio obtidos de galinhas infectadas artificialmente em ensaios realizados na Austrália, a PCR HP-2 tem demonstrada ser equivalente a cultura, porém é muito mais rápida. Amostras com pequena quantidade de patógenos, de má qualidade e atraso no transporte do material culminam em resultados falhos ou falsos negativos, sendo que as taxas de falhas são maiores em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos, fazendo com que a PCR seja uma opção atraente de diagnóstico, pois, mesmo em locais bem equipados e laboratórios de com altos recursos nos países desenvolvidos, o diagnóstico de coriza infecciosa pode ser um desafio tarefa. Para os laboratórios no mundo em desenvolvimento, que geralmente têm um menor nível de recursos e maiores problemas de contaminação, o diagnóstico de IC pela cultura e os bioquímicos subsequentes caracterização pode ser muito difícil. (CHEN et al., 1998a).

REFERÊNCIAS

- BEACH, J. R. The diagnosis, therapeutic, and prophylaxis of chicken-pox (contagious epithelioma) of fowls. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.58, p.301-312, 1920.
- BLACKALL, P. J.; REID, G. G. Further characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium*. **Veterinary Microbiology**, v.7, p.359-367, 1982.
- BLACKALL, P. J. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation patterns in avian *Haemophilus* species. **Journal of Microbiological Methods**, n.1, p.275-281, 1983.
- BLACKALL, P. J.; FARRAH, J. G. An evaluation of commercial discs for the determination of the growth factor requirements of the avian haemophili. **Veterinary Microbiology**, v.10, p.125-131, 1985.
- BLACKALL, P. J.; REID, G. G. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. **Avian Diseases**, v.31, p.527-532, 1987.
- BLACKALL, P. J. The avian *Haemophilus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, n.3, p.270-277, 1989.
- BLACKALL, P. J.; YAMAMOTO, R. "*Haemophilus gallinarum*"— a re-examination. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.469-474, 1989.
- BLACKALL, P. J.; MORROW, C. J.; McINNES, A.; EAVES, L. E.; ROGERS, D. G. Epidemiologic studies on infectious coryza outbreaks in northern New South Wales, Australia, using serotyping, biotyping, and chromosomal DNA restriction endonuclease analysis. **Avian Diseases**, v.34, n.2, p.267-276, 1990a.

- BLACKALL, P. J.; YAMAMOTO, R. Infectious coryza. In: **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**, 3rd ed. H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth and J.E. Pearson, eds. American association of avian pathologists, Ames, Iowa. p. 27-31, 1990b.
- BLACKALL, P. J.; ZHENG, Y. Z.; YAMAGUCHI, T.; IRITANI, Y.; ROGERS, D. G. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. **Avian Diseases**, v.35, n.4, p.955-959, 1991.
- BLACKALL, P. J.; SILVA, E. N.; YAMAGUCHI, T.; IRITANI, Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. **Avian Diseases**, v.38, p.269-274, 1994.
- BLACKALL, P. J.; MATSUMOTO, M. Infectious coryza. In: **Diseases of poultry**, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA. 2003. p.691-703.
- BLACKALL, P. J.; CHRISTENSEN, H.; BECKENHAM, T.; BLACKALL, L. L.; BISGAARD, M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. **Internacional Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, vol.55, n.pt1, p.353–362. 2005.
- BORNSTEIN, S.; SAMBERG, Y. The therapeutic affect of streptomycin on infectious coryza of chickens caused by *Haemophilus gallinarum*. III. In vitro and in vivo sensitivity of *H. gallinarum* to streptomycin. **Americian Journal of Veterinary Research**, v.16, p.321, 1955.
- BOWLES, R.; BLACKALL, P. J.; TERZOLO, H. R.; SANDOVAL, V. E. An assessment of the genetic diversity of Australian and overseas isolates of *Haemophilus paragallinarum* by multilocus enzyme electrophoresis. **Proc XTH World Vet Poult Assoc. Congress**, 148, 1993.

- BRAGG, R. R.; COETZEE, L.; VERSCHOOR, J. A. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.60, n.2, p.147-152, 1993.
- BUYS, S. B. *Haemophilus coryza*: therapy with selected drugs. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v.43, n.4, p.383-389, 1972.
- BYARUGABA, D. K.; MINGA, U. M.; GWAKISA, P. S.; KATUNGUKA, E. R.; BISGAARD, M. S, OLSE, J. E. Occurrence, isolation and characterisation of *Avibacterium paragallinarum* from poultry in Uganda. **Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**, 2006.
- CHEN, X.; MIFLIN, J. K.; ZANG, P.; BLACKALL, P. J. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. **Avian Diseases**, v.40, n.2, p.398-407, 1996.
- CHEN, X.; CHEN, Q.; ZANG, P.; FENG, W.; BLACKALL, P. J. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. **Avian Pathology: journal of W.V.P.A.**, vol. 27, p.296-300, 1998a.
- CHEN, X.; SONG, C; GONG, Y; BLACKALL, P. J. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. **Pathology: journal of W.V.P.A.**, vol. 27:3, p.296 — 300, 1998b.
- CLARK, B. S.; GODFREY, J. F. Studies of an inactivated *Haemophilus gallinarum* vaccine for immunization of chickens against infectious coryza. **Avian Diseases**, v.5, p.37-47, 1961.
- DE BLIECK, L. A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl (*coryza infec tious gallinarum*). **The Veterinary Journal**, v.88, p.9-13, 1932.

DELAPHANE, J. P.; ERWIN, L. E.; STUART, H. O. A hemophilic bacillus as the cause of an infectious rhinitis. **Bulletin / Agricultural Experiment Station of the Rhodes Island Stat College**, v.244, p.1-12, 1934.

DROUAL, R.; BICKFORD, A. A.; CHARLTON, B. R.; COOPER, G. L.; CHANNING, S. E. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. **Avian Diseases**, v.34, p.1009-1016, 1990.

ELLIOT, C. P.; LEWIS, M. R. A hemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.37, p.878-888, 1934.

FILHO, P. H. et al., Efeito de Genótipo e do Sistema de Criação sobre o Desempenho de Frangos Tipo Caipira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1883-1889, 2003 (Supl. 2)

FUJIWARA, H.; KONNO, S. Histopathological studies on infectious coryza of chickens. I. Findings in naturally infected cases. **National Institute of Animal Health Quarterly (Tokyo)**, v.5, p.36-43, 1965.

GROMKOVA, R.; KOORNHOF, H. J. Naturally occurring NAD independent Haemophilus parainfluenza. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.1031-1035, 1990.

HANLEY, J. E.; DAVIS, R. B.; SUNKKA, E. M. An evaluation and comparison of spectinomycin and spectinomycin-erythromycin combinations for infectious coryza. **Avian Diseases**, v.12, n.1, p.1-3, 1968.

HINZ, K. H. Beitrag zur Differenzierung von Haemophilus Stämmen aus Hühnern. II. Mitteilung: Serologische Untersuchungen im Objektträger-Agglutinations-Test. **Avian Pathology**, v.2, p.269-278, 1973.

HINZ, K. H. 1976. Beitrag zur Differenzierung von aemophilus-Stämmen aus Hühnern. IV. Mitteilung: Untersuchungen Über die Dissoziation von Haemophilus paragallinarum. **Avian Pathology**, v.5, p.51-66, 1976.

HINZ, K. H. Heat-stable antigenic determinants of Haemophilus paragallinarum. **Journal Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v.27B, n.8, p.668-676, 1980.

HOERR, F. J.; PUTNAM, M.; ROWE-ROSSMANITH, S.; COWART, W.; MARTIN, J. Case report: Infectious coryza in broiler chickens in Alabama. **Proceedings 43rd Western Poultry Disease Conference**, 42, 1994.

HORNER, R. F.; BISHOP, G. C.; HAW, C. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor independent bacterium. **Avian Pathology**, v.21, p.421-427, 1992.

HORNER, R. F.; BISHOP, G. C.; JARVIS, C. J.; COETZER, T. H. T. NAD (V-factor)-independent and typical Haemophilus paragallinarum infection in commercial chickens: a five year field study. **Avian Pathology**, v.24, p.453-463, 1995.

IRITANI, Y.; IWAKI, S.; YAMAGUCHI, T. Biological activity of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of Hemophilus gallinarum in chickens. **Avian Diseases**, v.25, n.29-37, 1981.

KATO, K. Infectious coryza of chickens IX. Protective effect of the merthiolate killed vaccine prepared from chicken meat infusion broth culture. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.29, p.165, 1967.

KHAN, M., CHEN, X.; BLACKALL, P. J. Differentiation of Haemophilus paragallinarum isolates using ERIC-PCR analysis. **Proceedings 47th Western Poultry Disease Conference**, 1998.

- KILIAN, M. A rapid method for the differentiation of Haemophilus strains. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and Immunology**, v. 82, n.6, p.835-842,1974.
- KUME, K.; SAWATA, A.; NAKASA, Y. Immunological relationship between Page's and Sawata's serotype strains of Haemophilus paragallinarum. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.757-760, 1980.
- KUME, K.; SAWATA, A.; NAKAI, T. Serologic and immunologic studies on 3 types of hemagglutinins of Haemophilus paragallinarum serotype 1 organisms. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.45, p.783-792, 1983.
- LANA, G. R. Q. Efeito da Densidade e de Programas de Alimentação sobre o Desempenho de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(4):1258-1265, 2001.
- MENDONZA-ESPINOZA, A.; KOGA, Y.; ZAVALETA, A. I. Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis for Identification of Avibacterium paragallinarum. **Avian Diseases**, v. 52, n.1, p.54-58, 2008.
- MIFLIN, J. K.; CHEN, X.; BLACKALL, P. J. Molecular characterisation of isolates of Haemophilus paragallinarum from China by ribotyping. **Avian Pathology**, v.27, p.119-127, 1997.
- MOUAHID, M.; BISGAARD, M.; MORLEY, A. J.; MOTTTERS, R.; MANNHEIM, W. Occurrence of V factor independent strains of Haemophilus paragallinarum. **Veterinary Microbiology**, v.31, p.363-368, 1992.
- PAGE, L. A. *Haemophilus* infections in chickens. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. **American Journal of Veterinary Research**, v.23, p.85- 95, 1962a.

PAGE, L. A. *Haemophilus* infections in chickens: III factors in intraflock transmission of infectious coryza and its chemical and antibiotic therapeusis. **Avian Diseases**, v.6, p.211, 1962b.

PAGE, L. A.; ROSENWALD, A. S.; PRICE, F. C. *Haemophilus* infections in chickens. IV Results of laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by *Haemophilus gallinarum*. **Avian Diseases**, v.7, p.239-256, 1963.

POERNOMO, S.; SUTARMA, RAFIEE, M.; BLACKALL, P. J. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. **Australian Veterinary Journal**, v.78, n.11, p.759-762, 2000.

RIMLER, R. B.; SHOUS, E. B.; BROWN, J.; DAVIS, R. B. The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of *Haemophilus* species pathogenic to chickens. **Journal of Veterinary Microbiology**, v.98, p.349-354, 1977.

RIMLER, R. B.; DAVIS, R. B. Infectious coryza: In vivo growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, p.1591-1593, 1977.

RIMLER, R. B. Studies of the pathogenic avian haemophili. **Avian Diseases**, v.23, p.1006-1018, 1979.

SALMON, S. A., WATTS, J. L. Minimum inhibitory concentration determination for various antimicrobials against 1570 bacterial isolates from turkey poults. **Avian Diseases**, v.44, p.85-98, 2000.

SANDOVAL, V. E.; TERZOLO, H. R.; BLACKALL, P. J. Complicated infectious coryza cases in Argentina. **Avian Diseases**, v.38, p.672-678, 1994.

SATO, S.; SHIFRINE, M. Serologic response of chickens to experimental infection with *Haemophilus gallinarum*, and their immunity to challenge. **Poultry Science**, v.43, p.1199-1204, 1964.

SAWATA, A.; KUME, K.; NAKASE, Y. Antigen structure and relationship between serotypes and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, p.1450-1453, 1979.

SAWATA, A.; KUME, K.; NAKASE, Y. Biologic and serologic relationships between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.1901-1904, 1980.

SAWATA, A.; KUME, K.; NAKASE, Y. Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 2 organisms: occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.1311-1314, 1982.

SAWATA, A.; KUME, K. Relationship between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, p.49-55, 1983.

SAWATA, A.; KUME, K.; NAKAI, T. Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.46, p.475-486, 1984.

SAWATA, A.; NAKAI, T.; KUME, K.; YOSHIKAWA, H.; YOSHIKAWA, T. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or non-encapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.2346-2353, 1985.

SCHALM, O.; BEACH, J. R. Studies on infectious coryza of chickens with special reference to its aetiology. **Poultry Science**, v.15, n.473-482, 1936.

SMIDT, O. CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE CAPSULE TRANSPORT GENE REGION FROM *Haemophilus paragallinarum*.

Dissertação mestrado. 2001. Faculdade Natural Science and Agriculture, Department of Microbiology and Biochemistry, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa. 2001.

TERZOLO, H. R.; PAOLICCHI, F. A.; SANDOVAL, V. E.; BLACKALL, P. J.; YAMAGUCHI, T.; IRITANI, Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. **Avian Diseases**, v.37, p.310-314, 1993.

WINDSOR, H. M.; GROMKOVA, R. C.; KOORNHOF, H. J. Plasmid mediated NAD independence in *Haemophilus parainfluenza*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2415-2421, 1991.

YAMAGUCHI, T.; BLACKALL, P. J.; TAKIGAMI, S.; IRITANI, Y.; HAYASHI, Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. **Avian Diseases**, v.34, p.964-968, 1990.

YAMAMOTO, R.; CLARCK, G. T. Intra- and interflock transmission of *Haemophilus gallinarum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.27, p.1419-1425, 1966.

YAMAMOTO, R. Infectious Coryza. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBOLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W., Jr. (eds.). **Diseases of Poultry**, 6th ed. Iowa State University Press: Ames, IA, p.272-281, 1972.

YAMAMOTO, R. Infectious coryza. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBOLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W., Jr. (eds.). **Diseases of Poultry**, 7th ed. Iowa State University Press: Ames, IA, p.225-232, 1978.

YAMAMOTO, R. Infectious coryza. In: CALNEK, B. W. (Ed.). et al. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.186-195.

ZAINI, M. Z.; KANAMEDA, M. Susceptibility of the indigenous domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) to experimental infection with *Haemophilus paragallinarum*. **Journal of Veterinary Malaysia**, v.3, p.21-24, 1991.

ARTIGO CIENTÍFICO

**IDENTIFICAÇÃO DE *Avibacterium paragallinarum* EM FRANGOS
DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

(Artigo a ser encaminhado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

IDENTIFICAÇÃO DE *Avibacterium paragallinarum* EM FRANGOS DE CORTE E POEDEIRAS COMERCIAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Abstract: The Brazilian poultry industry is susceptible to infectious disease outbreaks related to economic losses, mainly for infectious diseases caused by *Mycoplasma*, *Avibacterium paragallinarum* and viruses affecting the respiratory tract. The objective of this study researching the involvement of *A. paragallinarum* in avian respiratory disease outbreak. We collected 18 swabs of intranasal content of birds, of which 6 samples of chickens with clinical signs and 12 hens with clinical signs. Samples were grown in specific media for the agent also tested with the molecular technique of Polymerase Chain Reaction. Of the samples analyzed in isolation, 100% were negative. PCR in only two (16,66%) were positive. The detection of *A. paragallinarum* PCR in laying hens with clinical signs respiratory indicates that this bacterium is associated with the etiology of respiratory syndrome in poultry farms in the state of Pernambuco.

Index terms: infectious coryza, PCR, isolation.

Resumo: As aves da indústria avícola brasileira são suscetíveis a surtos de doenças infecciosas relacionadas a perdas econômicas, principalmente por enfermidades infecciosas causadas por *Mycoplasma*, *Avibacterium paragallinarum* e vírus que acometem o trato respiratório. Objetivou-se neste estudo pesquisar o envolvimento do *A. paragallinarum* em surto de doença respiratória aviária. Foram coletados 18 swabs da região infraorbitária dos seios nasais de aves, sendo 6 amostras de frangos de corte com sinais clínicos e 12 de poedeiras com sinais clínicos. As amostras foram cultivadas em meios específicos para o agente e também testadas com a técnica molecular Reação em Cadeia de Polimerase. Das amostras analisadas no isolamento, 100% foram negativas. Na PCR, duas (16,66%) foram positivas. A detecção de *A. paragallinarum* na PCR em galinhas poedeiras com sinais clínicos respiratórios indica que esta bactéria está associada à etiologia da síndrome respiratória das aves nas granjas no estado de Pernambuco.

Termos de indexação: Coriza infecciosa, PCR, isolamento.

INTRODUÇÃO

A indústria avícola se caracteriza pela contínua agregação de novas tecnologias o que favorece a intensificação da produção de aves, colocando o Brasil como primeiro exportador de carne de frangos do mundo. Contudo, a indústria avícola brasileira é suscetível a surtos de doenças infecciosas relacionadas a perdas econômicas (Droual et al. 1990).

O impacto econômico causado pelas enfermidades das aves domésticas advém principalmente de doenças infecciosas causadas por *Mycoplasma* sp, *Avibacterium paragallinarum* e vírus que acometem o trato respiratório (Mouahid et al. 1989). Dentre estas se destaca a coriza infecciosa (CI) que é uma doença respiratória aguda, sub-aguda ou crônica, que acomete o trato respiratório superior de galinhas, causada pela bactéria *Avibacterium paragallinarum* (Droual et al. 1990; Yamamoto 1991).

A CI ocorre principalmente em granjas que possuem aves de múltiplas idades sendotambém influenciada por fatores ambientais como o clima, a superpopulação, a virulência da bactéria e a existência de infecções concorrentes que complicando a infecção (Sandoval et al. 1994). Essa doença desencadeia prejuízos econômicos, advindos da diminuição do desempenho do lote e uma redução acentuada (10-40%) na produção de ovos (Blackall & Matsumoto 2003).

O método tradicional definitivo para o diagnóstico de CI requer o isolamento da bactéria suspeita e em seguida uma caracterização bioquímica para confirmar a identidade do isolado (Blackall et al. 1997). O diagnóstico pode ser realizado com base nos sinais clínicos, em conjunto com a realização de exames microbiológicos e a reação em cadeia de polimerase (PCR) para a identificação precisa do agente, possibilitando a terapêutica mais adequada do caso e estabelecimento de programas de biosseguridade mais eficientes (Chen et al. 1996; Salmon & Watts 2000).

O estudo da CI é relevante pelas perdas econômicas provocadas pela doença, devido à importância desta enfermidade nos plantéis avícolas. Desta forma objetivou-se neste estudo identificar o *A. paragallinarum* em amostras dos seios infraorbitais de aves provenientes de granjas com surto de doença respiratória aviária no estado de Pernambuco, utilizando as técnicas microbiológicas e PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE), processo N° 23082.001526.

Amostragem

Foram colhidas 18 amostras de conteúdo intranasal de frango de corte e poedeira comercial. Dessas amostras, 12 foram formadas por “pools” constituídos de cinco aves cada (seis “pools” de poedeiras e seis “pools” de frangos de corte), além de seis amostras individuais de poedeiras comerciais. Todos os animais apresentavam sinais clínicos de doença respiratória.

Isolamento

As 12 amostras provenientes do *pool* foram submetidas ao isolamento, pois as demais, as seis coletadas por indivíduo estavam congeladas o que impossibilitou o processamento. Para o isolamento de *A. paragallinarum* foram utilizadas placas de Petri contendo ágar base sangue suplementado com soro de galinha e NAD (denominado TM / SN), incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ de acordo com Blackall et al. (1994).

Extração de DNA

Todas as amostras de conteúdo dos seios infraorbitais foram submetidas à extração de DNA, utilizando o kit comercial *Genomic DNA Purification*, conforme recomendações do fabricante (Wizard®).

PCR

Para reação de amplificação do DNA foi utilizada técnica descrita por Chen et al. (1996), com modificações, consistindo de primers específicos para *A. paragallinarum*. A reação de PCR constou de 2,75 µL de água ultrapura (Milli-Q) por amostra; 6,25 µL de mix; 0,5 µL de cada “primer” (HP - F1: 5'- TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT -3' e HP - R1: 5'- CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT -3') por amostra e 2,5 µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 12,50 µL. Como

controle positivo utilizou-se a cepa padrão cedida pelo professor Dr. Horácio Raúl Terzolo do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária da Argentina. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura (Milli-Q), em substituição ao DNA. As condições da reação consistiram de 25 ciclos de 94°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 2 min, seguida por um ciclo final de 94°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% por 30 min a 80 V e os fragmentos obtidos foram visualizado sob luz ultra violeta.

RESULTADOS

Os sinais clínicos observados nas aves doentes foram corrimento nasal leve ou abundante, edema facial e estertores respiratórios e os achados necroscópicos foram aerossaculite, presença de hemorragia e muco na traqueia. Das 12 amostras utilizadas no isolamento, 100% foram negativas. Das 6 amostras analisadas na PCR, as de frangos com presença de sinais clínicos respiratórios foram negativas na PCR, e, das 12 amostras de poedeiras, duas (16,66%) foram positivas nesta técnica.

DISCUSSÃO

Avibacterium paragallinarum tem um efeito econômico importante na indústria avícola, mesmo a doença sendo de desenvolvimento limitado (Yamamoto 1991). Narita et al. (1978) registraram o isolamento e identificação de *A. paragallinarum* no Brasil. Em laboratórios de países em desenvolvimento que geralmente têm um menor nível de recursos e muitos problemas de contaminação, o diagnóstico de CI pela cultura e a caracterização com testes bioquímicos é complicado (Chen et al. 1998b).

Algumas aves deste estudo apresentavam sinais clínicos sugestivos de CI, todavia esses sinais não são confirmatórios e as lesões patológicas não são patognomônicas (Byarugaba et al. 2006). Clinicamente, as galinhas com sinais sugestivos de CI, também podem estar acometidas por outras doenças, como por exemplo *Ornithobacterium rhinotracheale*, cólera aviária crônica, boubá aviária, síndrome da cabeça inchada e avitaminose (Amonsin et al. 1997; Blackall & Matsumoto, 2003).

Chen et al. (1998b) recomendaram que os suabes para isolamento de *A. paragallinarum* sejam transportados em G-PBS ou, simplesmente, armazenados secos e enviados para o laboratório a 4°C, com o período de uma semana entre o tempo de

coleta e o processamento da amostra, não influenciando negativamente nos resultados do teste de PCR, porém negativando em testes de cultura. A superioridade do teste de PCR em relação a cultura tradicional é evidente pelo fato de que para o sucesso na cultura, deve ser armazenado em local seco ou no G-PBS e esfregaços devem ser examinados dentro de no máximo três dias. Sendo assim, a PCR é um teste mais eficiente para detecção *A. paragallinarum* do que o cultivo microbiológico em situações em que dificuldades de transporte são encontradas. Esta situação foi enfrentada neste estudo, onde seis amostras foram enviadas ao laboratório congeladas o que impossibilitou a realização do cultivo.

As dificuldades na obtenção das amostras de boa qualidade devido ao transporte inadequado de galinhas vivas ou mortas ou amostras de tecido resultantes de necropsia sem condições adequadas de realização são bem conhecidas. Juntamente com o transporte, o isolamento e a identificação continua a dificultar o processo de diagnóstico da CI, mesmo em laboratórios que tenham plena condição de isolar e identificar esses micro-organismos, pois requer o crescimento de culturas puras em meios específicos (Chen et al. 1996; Byarugaba et al. 2006), podendo levar a resultados falso positivo ou negativo. Testes de diagnóstico baseados na PCR oferecem vantagens consideráveis para bactérias como *A. paragallinarum* que são fastidiosas e de difícil crescimento.

Chen et al. (1996) realizaram a identificação de diferentes cepas de *A. paragallinarum*, dentre elas, duas cepas brasileiras, empregando técnicas moleculares. Ainda, segundo esses autores, quando o cultivo e a técnica molecular foram utilizadas nas amostras de campo, a positividade na PCR foi significativamente maior do que a cultura. O melhor desempenho da PCR sobre a cultura para amostras de campo, provavelmente, reflete as dificuldades em obtenção de amostras de campo com qualidade suficiente para garantir o crescimento de *A. paragallinarum*.

A PCR pode ser usada diretamente em suabes de seio infraorbital como feito no neste estudo; é mais rápida do que a cultura convencional e identificação, podendo o resultado estar disponível dentro de seis horas, em contraste a métodos convencionais que levam pelo menos 3-5 dias. A PCR para diagnóstico de *A. paragallinarum* deve utilizada como um teste realizado no grupo ou plantel para que se tenha um custo reduzido (Chen et al. 1998b).

Os animais positivos neste trabalho são de granjas com histórico de vacinação, porém, apesar do amplo uso de vacinas contra a CI, a doença continua a ser um

problema grave na indústria avícola. As aves podem ser vacinadas com até vinte semanas de idade, depois de vinte semanas estas aves não podem ser revacinadas e a proteção conferida pela vacinação diminui com o aumento da idade das aves. A eficácia da vacina é, portanto, um problema, sendo necessárias alternativas para as vacinas disponíveis, como a produção de vacinas vivas (Blackall & Matsumoto 2003).

Em granjas onde vários grupos etários são concomitantes, pode ocorrer a propagação da doença para grupos etários suscetíveis, normalmente ocorrendo dentro de uma a seis semanas após as aves serem removidas da chocadeira para gaiolas de crescimento (Clark & Godfre 1961), que são os grupos com maiores chances de ter aves infectadas, pois estão a mais tempo na granja e já passaram pelo período de incubação da doença. Fato que pode justificar a positividade em poedeiras comerciais, pois são aves mais antigas no plantel, e podem estar mantendo contato com possíveis portadoras, que têm sido reconhecidas como o principal reservatório da infecção (Blackall et al. 1990).

CONCLUSÃO

A detecção de *A. paragallinarum* na PCR em galinhas poedeiras com sinais clínicos respiratórios indica que esta bactéria está associada à etiologia da síndrome respiratória das aves nas granjas no estado de Pernambuco. A PCR pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico e/ou monitoria da Coriza infecciosa em criação avícola comercial.

REFERÊNCIAS

- AMONSIN, A.; WELLEHAN, J.; LI, L. L.; VANDAMME, P.; LINDEMAN, C.; EDMAN, M.; ROBINSON, R. A.; KAPUR, V. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p.2894-2898, 1997.
- BLACKALL, P. J.; MORROW, C. J.; McINNES, A.; EAVES, L. E.; ROGERS, D. G. Epidemiologic studies on infectious coryza outbreaks in northern New South Wales, Australia, using serotyping, biotyping, and chromosomal DNA restriction endonuclease analysis. **Avian Diseases**, v.34, n.2, p.267-276, 1990.
- BLACKALL, P. J.; SILVA, E. N.; YAMAGUCHI, T.; IRITANI, Y. Characterization of isolates of avian haemophilus from Brazil. **Avian Diseases**, v.38, p.269-274, 1994.

- BLACKALL, P. J.; MATSUMOTO, K.; YAMAMOTO, R. Infectious coryza. In: **Poultry diseases**. CALNEK, R. W., ed. Mosby-Wolfe, London, United Kingdom. 1997. p.179–190.
- BLACKALL, P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. **Clinical Microbiology Reviews**, vol.12, p.627–632. 1999.
- BLACKALL, P. J.; MATSUMOTO, M. Infectious coryza. In: **Diseases of poultry**, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA. 2003. p.691–703.
- BLACKALL, P. J.; CHRISTENSEN, H.; BECKENHAM, T.; BLACKALL, L. L.; BISGAARD, M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. **Internacional Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, vol.55, n.pt1, p.353-362. 2005.
- BYARUGABA, D. K.; MINGA, U. M.; GWAKISA, P.S.; KATUNGUKA, E. R.; BISGAARD, M. S, OLSE, J. E. Occurrence, isolation and characterisation of *Avibacterium paragallinarum* from poultry in Uganda. **Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**, 2006.
- CHEN, X.; MIFLIN, J. K.; ZANG, P.; BLACKALL, P. J. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. **Avian Diseases**, v.40, n.2, p.398–407, 1996.
- CHEN, X.; CHEN, Q.; ZANG, P.; FENG, W.; BLACKALL, P. J. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. **Avian Pathology: journal of W.V.P.A.**, vol.27, p.296–300, 1998.
- CLARK, B. S.; GODFREY, J. F. Studies of an inactivated *Haemophilus gallinarum* vaccine for immunization of chickens against infectious coryza. **Avian Diseases**, v.5, p.37-47, 1961.
- DROUAL, R. A. A.; BICKFORD, A. A.; CHARLTON, B. R.; COOPER, G. L.; CHANNING, S. E. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. **Avian Diseases**, vol.34, n.4, p.1009–1016, 1990.
- MOUAHID, M.; BOUZOUBAA, K.; ZOUAGUI, Z. Chicken infectious coryza in Morocco: epidemiological study and pathogenicity trials. **Actes de l'Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II**, vol.9, p.11–16, 1989.
- SALMON, S. A., WATTS, J. L. Minimum inhibitory concentration determination for various antimicrobials against 1570 bacterial isolates from turkey poults. **Avian Diseases**, v.44, p.85-98, 2000.

SANDOVAL, V. E.; TERZOLO, H. R.; BLACKALL, P. J. Complicated infectious coryza cases in Argentina. **Avian Diseases**, vol.38, p.672–678, 1994.

YAMAMOTO, R. Infectious coryza. In: CALNEK, B. W. (Ed.). et al. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.186-195.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). **Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos

demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel

brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.