

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE  
*Ornithobacterium rhinotracheale* DO BRASIL

**Marisa Macagnan**

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE  
*Ornithobacterium rhinotracheale* DO BRASIL

Autor: Marisa Macagnan

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias, na área de concentração de  
Microbiologia Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE

2006

Aos meus pais pelo carinho, confiança e compreensão.

Aos meus irmãos Mário e Milton (*in memoriam*) por servirem de exemplo para mim.

As minhas irmãs Miria e Maristela e ao meu sobrinho Kaynnan pelo carinho e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal pela orientação, confiança, apoio e incentivo.

Ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva por disponibilizar sua infraestrutura para a realização deste trabalho. Um agradecimento muito especial a todos os professores e alunos deste laboratório pela colaboração e amizade.

À professora Ana Paula Ravazzolo pelo apoio e por disponibilizar a infra-estrutura de seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Virologia, Carla Rosane Rodenbusch, Laura de Almeida, Cristiana Portz, Fabrício Bortolanza, Flavio Silva, Simone Simionatto, Josiane Griebeler, Laurício Rubin, André Felipe Streck, Fernanda Simone Marks, Alfredo Bianco Jr. e Thales Furian, pela amizade, paciência e ajuda prestada.

À colega Clarissa Vaz pela amizade e pelo auxílio técnico-científico.

Aos amigos do Laboratório de Micologia, professor Laerte Ferreiro e Edna Sanches pelo incentivo, carinho e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Veterinária, Dona Orema Souza e Sr. Santinho Fontana pela disposição em colaborar em etapas importantes deste trabalho.

Aos meus colegas e ex-colegas da casa do estudante (CEFAV) pela amizade, coleguismo e pelos momentos de felicidade compartilhados durante o período de permanência nesta casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS e ao CNPq pela oportunidade de realização desta dissertação.

## RESUMO

*Ornithobacterium rhinotracheale* é uma bactéria associada com doença respiratória, decréscimo no crescimento, condenação de carcaças e mortalidade em galinhas e perus. Esta bactéria tem sido isolada em vários países e, recentemente, foi isolada no Brasil pelo nosso grupo que também estabeleceu um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a sua detecção e identificação e determinou a prevalência de anticorpos contra esta bactéria em plantéis comerciais de frangos e de matrizes da Região Sul do Brasil. O presente trabalho teve o objetivo de caracterizar isolados de *O. rhinotracheale* através de sorotipificação, resistência a antimicrobianos e *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SAFLP). Vinte e sete isolados foram compatíveis com esta espécie através de isolamento em ágar sangue com gentamicina, coloração de Gram, teste de aglutinação em lâmina e reação em cadeia da polimerase. Dezenove isolados foram classificados como sorotipo A, seis não puderam ser sorotipificados com o painel de soros existentes e dois pertenceram ao sorotipo C. Vinte e cinco isolados foram sensíveis à norfloxacin, amoxicilina, doxiciclina, lincomicina e cefalotina, dois isolados foram resistentes à neomicina e 18 foram resistentes à sulfametoxazol/trimetoprima. Na análise de SAFLP, 22 isolados apresentaram padrão idêntico e os cinco isolados restantes foram classificados em cinco padrões distintos. Os resultados da sorotipificação indicaram que o sorotipo A de *O. rhinotracheale* é predominante em criações comerciais no Brasil. Os isolados brasileiros foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados. O poder discriminatório do teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi maior do que a sorotipificação e SAFLP, porém o método de SAFLP gerou um maior número de padrões, sugerindo que possa ser utilizado como ferramenta em estudos epidemiológicos.

## **ABSTRACT**

*Ornithobacterium rhinotracheale* is a bacteria associated with respiratory disease, growth retardation, condemnation of carcasses and mortality in chickens and turkeys. This bacteria has been isolated in several countries and, recently, our group has isolated it, established a polymerase chain reaction (PCR) protocol to detect and to identify and have determined the prevalence of antibodies against this bacteria in broilers and breeders from Southern Brazil. The aim of this study was to characterize isolates of *O. rhinotracheale* through serotyping, antimicrobial resistance and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP). Twenty-seven isolates were compatible with *O. rhinotracheale* through isolation on blood agar with gentamicin, Gram staining, slide agglutination test and PCR. Nineteen isolates were classified as serotype A, six isolates could not be serotyped with available panel of antisera and two isolates belonged to serotype C. Twenty-five isolates were sensitive to norfloxacin, amoxicillin, doxycycline, lincomycin and cefalotine, two isolates were resistant to neomycin and eighteen were resistant to sulphamethoxazole-trimethoprim. In the analysis of SAFLP, twenty-two isolates displayed one identical pattern and the five remaining isolates were classified in five distinct patterns. Results of this study indicate that serotype A of *O. rhinotracheale* predominate in commercial chickens in Brazil. Brazilian isolates were sensitive to most of the antimicrobials tested. The discriminatory power of antimicrobial susceptibility testing was higher than the serotyping and SAFLP, but the latter method generated a higher number of patterns, suggesting that it can be a useful tool in *O. rhinotracheale* epidemiological studies.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
3. ARTIGO CIENTÍFICO .....	22
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO .....	25
MATERIAL E MÉTODOS .....	26
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO .....	34
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
4. CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS.....	46

## INTRODUÇÃO

A partir da década de 70, o Brasil iniciou uma nova fase na produção avícola através da incorporação de um avançado aporte tecnológico na área de sanidade, genética, nutrição e manejo, consolidando a avicultura como a atividade mais dinâmica dentro do complexo agroindustrial brasileiro de carnes.

Os avanços obtidos permitiram que o país atingisse o topo no comércio internacional de carne de frango. Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (2006), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o maior exportador de carnes de aves, colocando o frango entre os principais produtos agrícolas brasileiros exportados. Além disso, a avicultura brasileira vem se destacando pela produtividade e baixo custo de produção, contribuindo para que o país tenha um grande potencial competitivo em nível mundial.

Para manter a competitividade dentro dos patamares da economia mundial e atender a crescente demanda interna e externa do produto, tornou-se necessário incrementar a produtividade. Em razão disso, a maximização da utilização dos galpões, com o aumento da densidade de aves, apresentou-se como a alternativa técnica e econômica mais viável. Contudo, um dos maiores problemas decorrentes do aumento da lotação dos galpões é a piora na qualidade do ar respirado pelas aves, provocando lesões no trato respiratório e criando condições favoráveis para a instalação e multiplicação de agentes etiológicos de enfermidades respiratórias.

No campo, as doenças respiratórias caracterizam-se pela rápida disseminação e por terem etiologia complexa, em que vários agentes e fatores estão envolvidos simultaneamente, resultam em agravamento do quadro clínico do lote afetado. Conseqüentemente, a sua ocorrência está entre as maiores causas de perdas econômicas na avicultura industrial.

Uma ampla gama de agentes infecciosos pode causar enfermidades respiratórias em aves, como fungos (*Aspergillus sp.*), vírus (pneumovírus aviário, vírus da doença de Newcastle, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, vírus da laringotraqueíte infecciosa) ou bactérias (*Escherichia coli*, *Avibacterium paragallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*,



*M. sinoviae*, *M. meleagridis*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Bordetella avium* e *Ornithobacterium rhinotracheale*, que foi descrita pela primeira vez em 1994.

A *O. rhinotracheale* pode ser a causa de uma importante doença emergente na avicultura industrial. A infecção causada por este patógeno pode provocar doença respiratória, menor desenvolvimento corporal, mortalidade, condenação de carcaças e queda de postura. Além de aves de produção comercial, aves silvestres também são suscetíveis à infecção por *O. rhinotracheale*.

No Brasil, esta bactéria era considerada exótica pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Contudo, sua presença foi comprovada em nossos plantéis avícolas por meio de isolamento microbiológico convencional (LEÃO, 2002; CANAL et al., 2005), detecção de anticorpos (ARNS et al., 1998; CANAL et al., 2003a) e detecção do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (CANAL et al., 2003b).

Embora a *O. rhinotracheale* tenha sido isolada e identificada em nosso país, até o momento não há estudo caracterizando isolados brasileiros quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, além da diversidade genética e antigênica.

Analisar o perfil de resistência a antimicrobianos é importante do ponto de vista do controle desta bactéria, uma vez que a resistência adquirida a estas drogas tem sido relatada por pesquisadores de outros países e pode diminuir a eficiência do tratamento utilizado.

A diferenciação molecular e antigênica de isolados de *O. rhinotracheale* pode ser útil para determinar a origem da infecção e mecanismos de difusão do agente, além de determinar os sorotipos que devem constituir as vacinas e, desta forma, auxiliar na implementação de estratégias de controle eficientes.

Muitos métodos de caracterização molecular têm sido usados com o propósito de analisar a diversidade genômica de microrganismos, entre os quais o método *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SAFLP). SAFLP é uma técnica que se caracteriza pela reprodutibilidade de resultados, execução relativamente rápida e simples e baixo custo financeiro de implementação (GIBSON et al., 1998).

A partir disso, o objetivo deste estudo foi analisar o padrão de suscetibilidade a antimicrobianos e a variabilidade antigênica e genética de isolados de *O. rhinotracheale* provenientes de diferentes regiões do Brasil e isolados no período de 2001 a 2005.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Introdução

*Ornithobacterium rhinotracheale* é uma bactéria associada com doença respiratória e que tem sido isolada cada vez mais frequentemente de galinhas e perus. A *O. rhinotracheale* pode causar doença aguda, altamente contagiosa nas aves, mas o quadro clínico é extremamente variável e é influenciado por muitos fatores ambientais, como manejo impróprio, ventilação inadequada, alta densidade, condições precárias da cama, níveis de amônia elevados, doenças intercorrentes e infecções secundárias (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003).

### 2.2. Histórico

Em 1991, na África do Sul, du Preez observou uma nova doença respiratória em frangos de corte. As aves acometidas pela infecção apresentavam lesões nos sacos aéreos diferente daquelas tradicionalmente observadas. Exames bacteriológicos revelaram um bacilo de crescimento lento, pleomórfico, microaerófilo e Gram negativo que não pôde ser classificado como pertencente a espécies de bactérias conhecidas (VAN BEEK et al., 1994 *apud* VAN EMPEL; HAFEZ, 1999). Amostras de bactéria com características morfológicas e bioquímicas idênticas aos isolados da África do Sul foram isoladas de patos acometidos por doença respiratória na Hungria em 1987 e de perus com manifestação clínica respiratória na Alemanha em 1991 e 1992 (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999). Mais tarde, estes isolados não identificados foram designados como *Ornithobacterium rhinotracheale* (VANDAMME et al., 1994).

A primeira caracterização da *O. rhinotracheale* foi realizada por Charlton et al. (1993) que analisaram, por meio de testes bioquímicos e perfil dos ácidos graxos celulares, isolados de um bacilo pleomórfico e Gram negativo coletados entre 1990 e 1991 de aves domésticas que apresentavam problemas respiratórios na Califórnia.

Embora a *O. rhinotracheale* tenha sido descrita somente na década de 90, a investigação de coleções de culturas bacterianas revelou que a *O. rhinotracheale* já havia

sido isolada do trato respiratório de perus em 1981 na Alemanha (HINZ; BLOME; RYLL, 1994). Na Bélgica, França e Israel, a *O. rhinotracheale* também foi isolada antes de 1990 (VANDAMME et al., 1994).

Desde o primeiro relato de isolamento de *O. rhinotracheale*, vários casos de infecção respiratória associados a esta bactéria foram relatados na França, Alemanha, Itália, Holanda, Bélgica, Reino Unido, Estados Unidos, Eslovênia, Israel, Jordânia, Turquia, Japão, África do Sul, Peru e México (AMONSIN et al., 1997; VAN EMPEL et al., 1997; JOUBERT et al., 1999; ZORMAN-ROJS et al., 2000; SAKAY et al., 2000; HUNG; ALVARADO, 2001; EL-SUKHON; MUSA; AL-ATTAR, 2002; SORIANO et al., 2002; TURAN; AK, 2002). Em 2001, a *O. rhinotracheale* foi isolada pela primeira vez no Brasil (LEÃO, 2002; CANAL et al., 2005).

### 2.3. Etiologia

A *O. rhinotracheale* pertence à rRNA superfamília V e assemelha-se aos gêneros *Cytophaga*, *Riemerella*, *Flavobacterium*, *Weeksella*, *Sporocytophaga* e *Capnocytophaga* (VANDAMME et al., 1994). Inicialmente, a nova bactéria foi descrita como Bacilo Pleomórfico Gram Negativo (CHARLTON et al., 1993), *Pasteurella-like* (HAFEZ et al., 1993 *apud* VAN EMPEL; HAFEZ, 1999), *Kingella-like* (VAN BEEK et al., 1994 *apud* VAN EMPEL; HAFEZ, 1999) ou Taxon 28 (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999). Em 1994, usando parâmetros de taxonomia genética, esta bactéria foi denominada *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov. (VANDAMME et al., 1994).

A *O. rhinotracheale* é um bacilo Gram negativo, imóvel, altamente pleomórfico e não esporulado. Os bacilos medem 0,2-0,9 µm de largura e 0,6-5 µm de comprimento. Até o momento, não foi relatada a presença de propriedades estruturais especiais como *pili* e fímbrias, ou produção de substâncias com atividade tóxica nesta espécie (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003). A presença de plasmídeo em isolados de galinha que apresentaram resistência a antimicrobianos foi relatada por Back et al. (1997).

A *O. rhinotracheale* é uma bactéria fastidiosa, por isso devem ser oferecidas condições adequadas de cultivo para que se obtenha sucesso no seu isolamento (JOUBERT et al., 1999). O cultivo pode ser realizado em aerobiose ou anaerobiose, porém uma melhor

multiplicação é obtida em microaerofilia com 7% de CO<sub>2</sub>. O crescimento ótimo é observado a 37°C, porém a bactéria pode multiplicar-se entre 30 e 40°C (CHARLTON et al., 1993). Ágar suplementado com 5–10% de sangue de carneiro é comumente utilizado para o isolamento primário, porém em amostras clínicas contaminadas com bactérias de crescimento rápido, as colônias de *O. rhinotracheale* podem ser encobertas e não serem detectadas (HAFEZ, 1998). Uma vez que a maioria dos isolados desta bactéria são resistentes à gentamicina, a adição deste antimicrobiano ao ágar sangue reduz o crescimento de contaminantes, facilitando o isolamento de *O. rhinotracheale* (BACK; NAGARAJA; HALVORSON, 1996). Nessas condições, a bactéria desenvolve colônias minúsculas após 24 h de incubação e, com 48 h, as colônias são pequenas, circulares, não-hemolíticas, com coloração branca a cinzenta. No primeiro isolamento, a maioria das colônias apresenta variação no diâmetro (1–3 mm) após 48 h de incubação, porém, quando subcultivadas, as colônias tornam-se mais uniformes (VAN EMPEL et al., 1997).

#### **2.4. Variabilidade antigênica e genética**

Até o momento, foram identificados 18 sorotipos, cuja designação vai da letra A até R (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003). O sorotipo A tem sido o mais prevalente entre as amostras de *O. rhinotracheale* isoladas de galinhas e perus (VAN EMPEL et al., 1997; ODOR et al., 1997; SAKAI et al., 2000; HUNG; ALVARADO, 2001; CAUWERTS et al.; 2002; EL-SUKHON; MUSA; AL-ATTAR, 2002; TURAN; AK, 2002). Os isolados de perus apresentam uma maior heterogeneidade em relação aos sorotipos (VAN EMPEL et al., 1997; HAFEZ; STING, 1999). Em alguns isolados observa-se reações cruzadas entre os sorotipos A, B, D e E (VAN EMPEL et al., 1997).

Devido à dificuldade de isolamento e identificação através de técnicas microbiológicas convencionais, a aplicação de métodos de diagnóstico genético-molecular tem sido extremamente eficiente na elaboração do diagnóstico de *O. rhinotracheale* de uma forma rápida e confiável. Além disso, as técnicas de biologia molecular têm sido úteis para detectar diversidade genética entre os isolados de *O. rhinotracheale*.

Num estudo realizado por Amonsin et al. (1997) foram analisados 55 isolados de *O. rhinotracheale* através de *repetitive extragenic palindromic* PCR (rep-PCR), sendo

observado uma menor variação no perfil genotípico de isolados de aves domésticas, quando comparados com isolados de aves silvestres. Os resultados dessa investigação sugerem que esta bactéria tenha sido introduzida nas aves domésticas a partir de aves silvestres.

Van Empel et al. (1998a) caracterizaram 56 isolados de *O. rhinotracheale* oriundos de diversos países e de diferentes espécies de aves comerciais por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) da proteína de membrana externa e por *amplified fragment length polymorphism* (AFLP). O perfil de peptídeos da membrana externa apresentou uma alta similaridade, sugerindo que os isolados testados foram representados por um pequeno grupo de clones proximamente relacionados. Os resultados de AFLP, entretanto, mostraram uma maior heterogeneidade, indicando a existência de subespécies ou mesmo espécies dentro do gênero *Ornithobacterium*. Estes resultados contrastam com aqueles obtidos por Koga; Zavaleta (2005), os quais demonstraram por rep-PCR uma alta similaridade entre 25 isolados de *O. rhinotracheale* de aves comerciais provenientes de diferentes hospedeiros e origens geográficas no Peru.

## 2.5. Hospedeiros

A *O. rhinotracheale* já foi isolada de galinha, peru, *chukar*, perdiz, faisão, pombo, pato, ganso, galinha d'Angola, gaivota, avestruz, codorna e gralha (CHARLTON et al., 1993; VANDAMME, 1994; DEVRIESE et al., 1995; LEROY-SÉTRIN et al., 1998; HAFEZ, 2002). Em aves comerciais, todas as idades parecem ser suscetíveis, porém foi observada uma maior patogenicidade em aves mais velhas (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003).

## 2.6. Transmissão

A *O. rhinotracheale* é transmitida horizontalmente por contato direto e indireto através de aerossóis ou água de beber (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003). Também há evidências de que possa ocorrer transmissão vertical, pois a *O. rhinotracheale* foi isolada de ovários e ovidutos de aves experimentalmente infectadas (BACK et al., 1998). Embora com baixa incidência (menor que 1%), a *O. rhinotracheale* também foi isolada da casca de

ovos e do saco da gema de pintos de um dia (VAN EMPEL; VAN DEN BOSCH; STORM, 1998b).

## **2.7. Sinais clínicos**

Em frangos de corte, a infecção geralmente ocorre entre 3 e 6 semanas de idade, podendo causar uma mortalidade de 2–10% (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003). As aves apresentam espirro, secreção nasal, dispnéia e edema facial. Os sinais respiratórios são acompanhados por prostração e redução do consumo de alimento e água (TRAVERS; CEOTZEE; GUMMOW, 1996; SORIANO et al., 2002).

Perus jovens infectados naturalmente apresentam-se clinicamente normais, porém em animais mais velhos tem sido observada uma maior severidade dos sinais clínicos. (ROEPKE et al., 1998; ZORMAN-ROJS et al., 2000). A mortalidade em lotes afetados pode atingir até 10% (BACK et al., 1998). As aves acometidas pela infecção apresentam depressão, dispnéia, espirro, descarga nasal, redução do ganho de peso (HINZ; BLOME; RYLL, 1994; JOUBERT et al., 1999; TURAN; AK, 2002). Expectoração de muco sanguinolento e cianose na barbela foram observadas em perus antes da morte (HINZ; BLOME; RYLL, 1994; ZORMAN-ROJS et al., 2000).

A doença afeta as matrizes na fase de postura, principalmente no início ou no pico de produção. O quadro clínico respiratório é leve, podendo haver redução na ingestão de alimento e pequeno aumento na mortalidade. Pode ocorrer queda na postura e redução no tamanho do ovo, porém a fertilidade e eclodibilidade não são afetadas na maioria dos casos (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003).

Sinais respiratórios brandos acompanhados por queda na produção de ovos e aumento da mortalidade também foram observados em poedeiras naturalmente infectadas por *O. rhinotracheale* (SPRENGER et al., 2000; SORIANO et al., 2002).

## **2.8. Lesões microscópicas e macroscópicas**

As lesões mais comumente encontradas em aves afetadas incluem sinusite, aerossaculite, traqueíte, pleurite e pneumonia uni ou bilateral (DE ROSA et al., 1996;

TRAVERS; CEOTZEE; GUMMOW, 1996; ODOR et al., 1997; JOUBERT et al., 1999; KOGA; ZAVALETA, 2005). Sinovite, artrite, pericardite e peritonite também foram relatadas (SPRENGER et al., 2000; VAN VEEN et al., 2000a). Em aves inoculadas experimentalmente, foi notada a presença de exsudato na cavidade abdominal, perihepatite e hidropericárdio (EL-SUKHON; MUSA; AL-ATTAR, 2002; SORIANO et al., 2002).

As lesões microscópicas são vistas principalmente nos pulmões, pleura e sacos aéreos. Em muitos casos, os pulmões apresentam hiperemia, edema perivascular e intersticial, com infiltração de heterófilos e linfócitos (DE ROSA et al., 1996; SPRENGER et al., 1998; JOUBERT et al., 1999). A pleura e os sacos aéreos podem estar edematosos e espessos, com acúmulo de fibrina intersticial e infiltrado heterofílico difuso e fibrose (CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003).

## 2.9. Patogenia

Muitos casos de infecção causados por *O. rhinotracheale* ocorrem concomitantemente com infecções provocadas por outros agentes patogênicos do trato respiratório, podendo levar a um aumento da severidade dos sinais e achados clínicos. Charlton et al. (1993) encontraram *Escherichia coli*, *Mycoplasma* spp., *Pasteurella* sp. ou *Bordetella avium* em 93% das amostras clínicas positivas para *O. rhinotracheale*. Além de *O. rhinotracheale*, Odor et al. (1997) isolaram *E. coli*, vírus da bronquite infecciosa, vírus da laringotraqueíte, vírus da doença de Newcastle e adenovírus de frangos de corte com manifestação clínica respiratória. Sprenger et al. (2000) relataram o isolamento de *O. rhinotracheale*, *E. coli*, *Streptococcus* sp. e vírus da bronquite infecciosa de poedeiras comerciais que apresentavam queda na produção de ovos, problemas respiratórios e aumento da mortalidade.

O papel desta bactéria como agente capaz de induzir sinais e lesões no trato respiratório de aves é discutível. Em condições experimentais, Ryll et al. (1996), Sprenger et al. (1998) e van Veen; Van Empel; Fabri (2000b) reproduziram a doença após desafio com *O. rhinotracheale*, sem a inoculação prévia de agentes virais, evidenciando a ação da *O. rhinotracheale* como patógeno primário. Em contrapartida, um estudo experimental realizado por van Empel et al. (1999) resultou em lesões insignificantes no trato respiratório

de galinhas desafiadas com esta bactéria, porém gerou uma resposta sorológica similar aquela obtida em aves desafiadas com *O. rhinotracheale* após uma infecção viral.

Além das condições de ambiente e manejo e a presença de outros microrganismos que exacerbam a patogenicidade da *O. rhinotracheale*, é possível que a severidade dos sinais clínicos e lesões estejam relacionados com características genéticas das cepas presentes em determinada região (BACK, 2004). Ryll et al. (1996), Travers; Ceotzee; Gummow (1996), van Veen; Van Empel; Fabri (2000b) e El-Sukhon; Musa; Al-Attar (2002) observaram que grupos de aves desafiados com diferentes isolados de *O. rhinotracheale* exibiram diferença em relação à manifestação clínica, sugerindo-se variações na virulência dos isolados usados. A origem da bactéria, porém, parece não ter efeito sobre a patogenicidade. Amostras isoladas de galinhas e perus apresentaram o mesmo efeito quando inoculadas nestas duas espécies, indicando que este patógeno é capaz de infectar igualmente várias espécies de aves (VAN EMPEL et al., 1996).

## 2.10. Epidemiologia

Dados obtidos de estudos epidemiológicos em diversos países demonstraram que a prevalência de *O. rhinotracheale* é muito variável. Na Alemanha, em 1998, foram testados 3153 amostras de soro provenientes de 27 lotes de frangos, 24 lotes de matrizes de corte e 143 lotes de perus de corte que apresentaram ou estavam recuperados de surtos de doença respiratória. Os resultados demonstraram que 79% das matrizes de corte, 26% dos frangos e 55% dos lotes de perus possuíam anticorpos contra *O. rhinotracheale* (HAFEZ; STING, 1996).

Sakay et al. (2000) examinaram o soro de aves comerciais coletados no período de 1997 e 1999 no Japão e demonstraram a presença de anticorpos para *O. rhinotracheale* em 13,5% dos frangos, 13,9% das matrizes e 12,7% das poedeiras analisadas.

Um estudo realizado na Turquia verificou a soroprevalência de *O. rhinotracheale* em 42 lotes de frango, resultando em 64% de positividade entre 384 soros testados (TURAN; AK, 2002).

No Brasil, Canal et al. (2003a) analisaram 1500 amostras de soros oriundas de 50 lotes de frango de corte e 480 amostras de soro de 40 lotes de matrizes pesadas e detectaram a



presença de anticorpos contra *O. rhinotracheale* em 63,83% dos lotes de frangos e em 100% dos lotes de matrizes.

El-Sukhon; Musa; Al-Attar (2002) investigaram bactérias que estavam envolvidas com aerossaculite em frangos de corte na Jordânia, dando especial referência a *E. coli*, *O. rhinotracheale* e *B. avium*. A *O. rhinotracheale* foi isolada em 8,8% das amostras analisadas, estabelecendo-se como o segundo agente mais importante na indução de aerossaculite naquele país.

### **2.11. Tratamento e controle**

A sensibilidade da *O. rhinotracheale* aos antimicrobianos é muito variável e depende da origem da amostra (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999). Isolados de perus nos Estados Unidos apresentaram diferença significativa em relação aos isolados da Alemanha em seu padrão de suscetibilidade frente a eritromicina e sarafloxacina (BACK et al., 1997). A porcentagem de amostras de *O. rhinotracheale*, isoladas entre 1996 e 1999 na Holanda, sensível a amoxicilina, tetraciclina, enrofloxacina e a associação de sulfonamida com trimetoprima diminuiu significativamente ao longo do tempo (VAN VEEN; HARTMAN; FABRI, 2001).

Em condições de campo, a administração de amoxicilina na água de beber foi altamente efetiva no tratamento de perus de corte acometidos de infecção por *O. rhinotracheale* (HINZ; BLOME; RYLL, 1994). A mortalidade de perus com manifestação clínica respiratória associada com *O. rhinotracheale* foi reduzida após a aplicação de oxitetraciclina na água, clortetraciclina na ração e espectinomicina, ceftiofur e penicilina via parenteral. Por outro lado, perus tratados com eritromicina na água e ceftiofur injetável não responderam ao tratamento, permanecendo com mortalidade alta (DE ROSA et al., 1996).

A *O. rhinotracheale* mostrou-se sensível a desinfetantes a base de ácidos orgânicos e aldeídos. A infecção, porém, parece ter se tornado endêmica, podendo afetar lotes novos, mesmo quando alojados em galpões limpos e desinfetados, principalmente em áreas com produção intensa e granjas com múltiplas idades (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999). A habilidade da *O. rhinotracheale* em manter-se viável em cama aviária por longos períodos

de tempo em baixas temperaturas pode contribuir para a perpetuação da infecção e difusão do agente (LOPES et al., 2002a). Além disso, a limpeza e a desinfecção inadequada após a remoção de lotes infectados pode disseminar a bactéria para lotes próximos e manter um ciclo de contaminação contínuo entre galpões (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999).

A prevenção e o controle de infecções causadas pela *O. rhinotracheale* baseiam-se, principalmente, em medidas de biossegurança e adoção de boas práticas de manejo. Além disso, a vacinação pode ser utilizada como uma alternativa para evitar surtos com este patógeno.

A vacinação de matrizes de corte com uma vacina inativada resultou em altos níveis de anticorpos maternos na progênie, conferindo proteção contra desafio experimental até 30 dias de idade. Já a administração de uma vacina viva resultou em uma porcentagem mais baixa de aerossaculite e pneumonia em frangos de corte desafiados com o vírus da doença de Newcastle e *O. rhinotracheale*. A combinação entre estas duas estratégias de vacinação pode ser um método eficiente para combater infecções por *O. rhinotracheale* em criações de frango de corte (VAN EMPEL; VAN DEN BOSCH, 1998).

Em condições de campo, Cauwerts et al. (2002) observaram que lotes de frangos de corte oriundos de matrizes imunizadas com uma vacina comercial contra *O. rhinotracheale* apresentaram uma menor mortalidade e um índice de produção mais alto quando comparados com lotes de frangos derivados de matrizes não vacinadas.

Lopes et al. (2002b) imunizaram perus com uma vacina mutante termo-sensível que resultou em uma diferença significativa nos escores de lesões entre animais vacinados e não vacinados, sugerindo-se a eficiência desta vacina em gerar proteção contra desafios por *O. rhinotracheale*.

Mais recentemente, Schuijffel et al. (2005) analisaram a habilidade de oito antígenos recombinantes (Or01, Or02, Or03, Or04, Or11, Or77, Or98A e Or98B), derivados de *O. rhinotracheale* sorotipo G, induzirem proteção cruzada frente a desafios com amostras heterólogas de *O. rhinotracheale*. A imunização de galinhas com vacinas compostas pelas 8 proteínas individualmente, demonstrou que o antígeno Or77 induziu resposta protetora contra sorotipos que expressaram Or77 *in vitro*. A combinação de quatro antígenos, incluindo ou não o antígeno Or77, também foi testada e resultou em proteção cruzada em ambas situações. Os resultados deste estudo sugeriram que o desenvolvimento de vacinas

com antígenos indutores de proteção cruzada poderia ser utilizado como uma estratégia eficaz no controle de infecções com diferentes sorotipos, uma vez que a habilidade de bacterinas inativadas em induzir proteção cruzada é variável.

## 2.12. Diagnóstico

O diagnóstico de *O. rhinotracheale* é baseado nos sinais clínicos, lesões e isolamento do agente etiológico. A identificação pode ser realizada através da caracterização morfológica, testes bioquímicos, enzimáticos e sorológicos (BACK, 2004) e detecção do ácido nucléico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se um par de iniciadores (*primers*) que amplifica 784 pares de bases do gene do RNA ribossomal 16S da *O. rhinotracheale* (VAN EMPEL et al., 1998a).

A traquéia, pulmões, sinus e sacos aéreos são os órgãos de eleição para o isolamento de *O. rhinotracheale*, porém Back et al. (1998), investigando a localização de *O. rhinotracheale* em diferentes tecidos de perus adultos após infecção experimental, obtiveram sucesso no cultivo da bactéria a partir do fígado, ovário, oviduto e baço. Em condições de campo, a *O. rhinotracheale* também foi isolada do coração, conjuntiva e saco da gema (CHARLTON et al., 1993). Além disso, van Empel et al. (1996) e Travers; Ceotzee; Gummow (1996) relataram o isolamento de *O. rhinotracheale* a partir de cérebro e articulações de animais experimentalmente infectados.

Os resultados dos testes bioquímicos podem ser inconsistentes, pois nem todos os isolados de *O. rhinotracheale* crescem em meio líquido. As propriedades bioquímicas da *O. rhinotracheale* são mais consistentes quando se utilizam meios adaptados. Devido à inconsistência dos resultados dos testes bioquímicos, é recomendada a utilização de métodos confiáveis para a identificação de *O. rhinotracheale* como, por exemplo a combinação de imunoprecipitação em gel de ágar (AGP) com o sistema API (Bio-Mérieux). O sistema API, entretanto nem sempre apresenta os mesmos os resultados quando o teste não é realizado sob ótimas condições (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999).

Existem outras bactérias que podem ocasionar manifestação clínica semelhante àquela observada com *O. rhinotracheale*, por isso, deve ser considerado o diagnóstico diferencial de *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica*, *P. gallinarum*, *R. anatipestifer*,

*Avibacterium paragallinarum* e *Bordetella avium* (VAN EMPEL; HAFEZ, 1999; CHIN; VAN EMPEL; HAFEZ, 2003).

### 2.13. Tipificação molecular

A combinação de ensaios fenotípicos e genotípicos tem auxiliado a determinar a origem e a relação genética através da discriminação de linhagens pertencentes a uma determinada espécie microbiana. Com o propósito de diferenciar isolados bacterianos mediante características fenotípicas, podem ser utilizados métodos como a sorotipificação e a determinação da sensibilidade a antimicrobianos. As diferenças na estrutura do DNA, entretanto, nem sempre são fenotipicamente expressadas, por isso técnicas moleculares, como *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), oferecem um maior grau de discriminação do que métodos fenotípicos (PETERS; THREFALL, 2001) e têm sido amplamente utilizadas para a tipificação de gêneros bacterianos.

AFLP é uma técnica de caracterização molecular que pode ser utilizada sem o prévio conhecimento da seqüência genômica, podendo ser aplicada a DNAs de qualquer origem e complexidade (VOS et al., 1995). A característica principal desta técnica é a sua capacidade de fazer a seleção de muitas regiões de DNA distribuídas randomicamente por todo o genoma (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

A técnica de AFLP consiste na clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição, ligação de adaptadores nas extremidades dos fragmentos de restrição e amplificação destes fragmentos. A seqüência dos adaptadores e o sítio de restrição adjacente servem como sítio para a hibridização dos *primers* e subsequente amplificação dos fragmentos. Na extremidade 3' dos *primers* são incluídos nucleotídeos seletivos, os quais promovem a amplificação de apenas um grupo de fragmentos. Somente fragmentos cujos nucleotídeos do sítio de restrição são complementares aos nucleotídeos seletivos serão amplificados (VOS et al., 1995). A análise dos fragmentos amplificados é realizada em gel de poliacrilamida, e desta forma, compara-se o padrão gerado para cada amostra (BLEARS et al., 1998).

Uma modificação da técnica, denominada *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SAFLP) vem sendo utilizada por diversos pesquisadores na tipificação

molecular de diversos gêneros bacterianos (VALSAGIACOMO et al., 1995; GIBSON et al., 1998; PETERS; THREFALL, 2001; SOOD et al., 2002). Na execução de AFLP são utilizadas duas enzimas de restrição, ao passo que SAFLP utiliza uma única enzima para a clivagem do DNA genômico. Desta forma, SAFLP gera um padrão de fragmentos de menor complexidade, cuja análise pode ser realizada em gel de agarose.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **3.1. Caracterização de isolados de *Ornithobacterium rhinotracheale* do Brasil**

Trabalho que será submetido à revista *Avian Pathology* após modificações e tradução.

### **Caracterização de isolados de *Ornithobacterium rhinotracheale* do Brasil**

Marisa Macagnan<sup>1</sup>, André F. Streck<sup>1</sup>, Clarissa S. L. Vaz<sup>1</sup>, Silvio L. S. Rocha<sup>2</sup>, Marisa R. I. Cardoso<sup>3</sup>, Mário S. Assayag Júnior<sup>4</sup>, Cláudio W. Canal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, (USP), São Paulo, SP, Brasil.

\*Corresponding author: Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 91540-000. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

## ABSTRACT

*Ornithobacterium rhinotracheale* is a bacteria associated with respiratory disease, growth retardation, condemnation of carcasses and mortality in chickens and turkeys. It has been isolated in several countries and, recently, our group has isolated it, established a polymerase chain reaction (PCR) protocol to detect and to identify and have determined the prevalence of antibodies against this bacteria in broilers and breeders from Southern Brazil. The aim of this study was to characterize isolates of *O. rhinotracheale* through serotyping, antimicrobial resistance and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP). Twenty-seven isolates were compatible with *O. rhinotracheale* through isolation on blood agar with gentamicin, Gram staining, slide agglutination test and PCR. Nineteen isolates were classified as serotype A, six isolates could not be serotyped with the available panel of antisera and two isolates belonged to serotype C. Twenty-five isolates were sensitive to norfloxacin, amoxicillin, doxycycline, lincomycin and cefalotine, two isolates were resistant to neomycin and eighteen were resistant to sulphamethoxazole-trimethoprim. In the analysis of SAFLP, twenty-two isolates displayed one identical pattern and the five remaining isolates were classified in five distinct patterns. Results of this study indicate that serotype A of *O. rhinotracheale* predominates in commercial chickens in Brazil. Brazilian isolates were sensitive to most of the antimicrobials tested. The discriminatory power of antimicrobial susceptibility testing was higher than the serotyping and SAFLP, but the latter method generated a higher number of patterns, suggesting that it can be a useful tool in *O. rhinotracheale* epidemiological studies.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheale*, chicken, respiratory disease, antimicrobial, SAFLP, serotype.



## INTRODUÇÃO

Doenças respiratórias causam prejuízos econômicos elevados para a avicultura industrial devido ao aumento da mortalidade, alto custo com medicamentos, condenação em abatedouros, queda na produção de ovos e diminuição da eclodibilidade. Entre os diversos patógenos envolvidos em manifestação clínica respiratória, está a *Ornithobacterium rhinotracheale*, uma bactéria Gram negativa e pleomórfica que, pela dificuldade de isolamento e identificação, somente foi descrita em 1994 (Vandamme et al., 1994).

Até o momento foram descritos 18 sorotipos de *O. rhinotracheale* (A-R) (Chin et al., 2003). O sorotipo A é o mais prevalente entre isolados de galinhas e perus, porém não há indicação de especificidade de hospedeiro entre os diferentes sorotipos identificados (van Empel et al., 1997).

Análises genotípicas revelaram maior distância evolutiva entre isolados de *O. rhinotracheale* provenientes de aves silvestres do que isolados de aves domésticas, sugerindo-se que a bactéria tenha se adaptado de aves silvestres para aves domésticas (Amonsin et al., 1997).

A sensibilidade desta bactéria a antimicrobianos é muito variável e depende da origem do isolado. Nos últimos anos, tem sido observada uma menor eficiência dos antimicrobianos no tratamento de infecções por *O. rhinotracheale*, o que pode estar associado a um aumento do nível de resistência adquirida a estas drogas (van Veen et al., 2001).

No Brasil, a presença desta bactéria foi evidenciada por meio de detecção de anticorpos (Arns et al., 1998; Canal et al., 2003a), detecção do DNA pela reação em cadeia

da polimerase (PCR) (Canal et al., 2003b) e isolamento microbiológico convencional (Canal et al., 2005). É necessária, entretanto, uma investigação mais detalhada sobre as cepas de *O. rhinotracheale* existentes no país. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil fenotípico, por meio de sorotipificação e determinação da sensibilidade a antimicrobianos, e o perfil genotípico, por *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SAFLP), de isolados de *O. rhinotracheale* provenientes de diferentes regiões do Brasil no período de 2001-2005.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e identificação da *O. rhinotracheale*

Cento e quatorze amostras de pulmão e traquéia, oriundas de aves industriais, e 49 suabes traqueais coletados de aves comercializadas em entrepostos que recebem aves de diferentes origens (aves não industriais) foram submetidos ao protocolo de isolamento de *O. rhinotracheale*. Doze isolados previamente obtidos no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA-UFRGS) foram incluídos neste estudo.

O protocolo de isolamento consistiu na semeadura das amostras em ágar sangue suplementado com 10 µg/mL de gentamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em jarra de microaerofilia com aproximadamente 7,5 a 10% de CO<sub>2</sub> (Back et al., 1996). As colônias suspeitas foram subcultivadas sob as condições já descritas e procedeu-se a confirmação por coloração de Gram, aglutinação rápida em lâmina (Canal et al., 2005) e reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica um fragmento de 784 pares de bases no gene do rRNA 16S da *O. rhinotracheale* (Canal et al., 2003b).

### **Serotipificação**

A determinação do sorotipo dos isolados de *O. rhinotracheale* foi gentilmente realizada pelo Dr. G. van den Bosch (Intervet International, Boxmeer, Holanda) de acordo com o método descrito por van Empel (1997).

### **Determinação da suscetibilidade a antimicrobianos**

Sete antimicrobianos utilizados em avicultura industrial foram selecionados para avaliar o perfil de resistência dos isolados obtidos. Os antimicrobianos testados foram amoxicilina (10 µg), norfloxacina (10 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg), neomicina (30 µg), cefalotina (30 µg), doxiciclina (30 µg) e lincomicina (2 µg). Foi utilizado o método de difusão em ágar, conforme recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (2001), com algumas modificações. Os isolados foram cultivados em ágar sangue com 5% de sangue de carneiro e incubados a 37°C por 24 horas. As colônias foram ressuspensas em solução salina 0,85% e a turbidez padronizada para a densidade 0,5 da escala de MacFarland. Imediatamente, os inóculos foram semeados na superfície de ágar Müller-Hinton (Merk) suplementado com 5% de sangue de carneiro, sobre o qual foram colocados os discos impregnados com os antimicrobianos (Cefar). As placas foram incubadas em jarras de microaerofilia a 37°C e a leitura do halo de inibição realizada após 24 horas. Os resultados foram comparados com os da tabela fornecida pelo fabricante dos discos de antimicrobianos. Como controle da qualidade dos antimicrobianos, foi utilizada a amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **Extração do DNA genômico**

A extração do DNA foi realizada pelo método do fenol/clorofórmio (Sambrook et al. 1989), com algumas modificações. Células frescas cultivadas em ágar sangue foram lisadas em 340 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) e 30 µL de lisozima (50 mg/mL) a 4°C por 30 minutos. A lise foi completada pela adição de 25 µL de SDS 10% e 2 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e incubação a 55°C durante 30 minutos. Foram realizadas duas extrações com fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (24:24:1 [vol/vol]), seguida por uma extração com clorofórmio. A precipitação foi feita com a adição de acetato de sódio e isopropanol e incubação por 30 minutos a -20°C. O sedimento foi lavado com etanol 80% e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE e a concentração e pureza das amostras foram determinadas pela leitura da absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech). As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da execução da PCR e de *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SAFLP). DNA de um isolado de *Pasteurella multocida* também foi extraído e utilizado como controle negativo na PCR e SAFLP.

### **PCR para identificação dos isolados**

A PCR foi realizada de acordo com Canal et al. (2003b), com algumas modificações. Brevemente, a reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo tampão (10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Biosciences), 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot Enzimas, Porto Alegre, Brasil), 40 pmol de cada iniciador específico para o gene do rRNA 16S da *O. rhinotracheale* (Bio-Synthesis) e 2 µL do DNA genômico (aproximadamente

100 ng). A amplificação foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) com um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de amplificação (94°C, 30 s; 60°C, 60 s e 72°C, 90 s) e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

### *Single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP)*

#### **Digestão enzimática e ligação do adaptador**

Foi utilizado o protocolo descrito por Gibson et al. (1998), com algumas modificações. Brevemente, alíquotas contendo 4 µg de DNA foram clivadas com 2 U de *Hind*III (Fermentas), por 3 horas a 37°C, em tampão (10 mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de KCl, 0,1 mg/mL de BSA, pH 8,5) num volume final de 50 µL.

Para a reação de ligação, foi utilizada uma alíquota de 5 µL de DNA clivado, 1 U de T4 DNA ligase (Fermentas), tampão (400 mM de Tris-HCl, 100mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de DTT, 5 mM de ATP, pH 7,8), e 0,2 µg de cada adaptador (Dialab Diagnósticos), num volume final de 20 µL, e incubado a 16°C por 3 horas. Os adaptadores utilizados foram: ADH1, 5´ACG GTA TGC GAC AG3´ e ADH2, 5´GAG TGC CAT ACG CTG TCT CGA3´ (Dialab Diagnósticos). O DNA ligado foi precipitado com acetato de amônia e etanol absoluto. A suspensão foi incubada a -20°C por 30 minutos, sendo em seguida centrifugada a 12.000 g por 15 minutos. O DNA foi lavado com etanol 80% e ressuspendido em TE.

### **PCR para análise de SAFLP**

As reações de amplificação foram realizadas conforme descrito por Gibson et al. (1998), com algumas modificações. Foi utilizado o *primer* 5´ GGT ATG CGA CAG AGC TTX 3´, cuja seqüência é complementar aos nucleotídeos adaptadores, sendo a base final 3´ (X) A, T, G ou C, constituindo quatro diferentes iniciadores (HI-A, HI-T, HI-G e HI-C). Uma alíquota de 5 µL do DNA ligado foi adicionada a uma mistura contendo 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Biosciences), tampão (10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl), 20 pmol de *primer* (Invitrogen), 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot Enzimas), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> em reações com os *primers* HI-A e HI-T e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> em reações com os *primers* HI-G e HI-C, em um volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Gene Amp PCR System 2400), consistindo de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguido de 36 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2,5 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio (0,5 mg/L). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e registrado por um sistema digital de fotodocumentação (Ultra Lum FP-1000, Paramount).

### **Análise dos dados**

A determinação do padrão foi realizada visualmente e foram considerados somente os fragmentos detectados em mais de uma reação e mais de uma eletroforese e que apresentaram entre 300 e 2072 pares de bases (pb). Foi considerado padrão de SAFLP distinto, o isolado que apresentasse ao menos uma banda diferente dos demais isolados

analisados. Para avaliar a reprodutibilidade da técnica, o DNA clivado de 20 isolados de *O. rhinotracheale* foi novamente amplificado e submetido à eletroforese.

A similaridade entre os isolados foi calculada pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento foi obtido por *unweighted pair-group method using an arithmetic average* (UPGMA), utilizando o programa NTSYS-PC versão 1.7 (Applied Biostatistics, 1992).

### **Poder discriminatório dos métodos**

A capacidade de discriminar os isolados de *O. rhinotracheale* de cada método utilizado neste estudo foi calculada através do Índice de diversidade de Simpson (D). Este índice é baseado na probabilidade de duas linhagens escolhidas aleatoriamente serem caracterizadas dentro do mesmo perfil (Hunter & Gaston, 1988).

## **RESULTADOS**

### **Identificação dos isolados**

Vinte e sete isolados, compreendendo 13 isolados obtidos anteriormente e 14 isolados obtidos a partir das amostras clínicas e dos suabes traqueais, foram identificados como bacilos Gram negativos pleomórficos, foram positivos na aglutinação rápida em lâmina e geraram produtos de amplificação de 784 pares de bases na PCR. Todos os isolados de *O. rhinotracheale* caracterizados neste estudo estão listados na Tabela 1. A PCR não gerou produto de amplificação de 784 pares de bases no DNA de *P. multocida*.

### **Serotipificação**

Dos 27 isolados de *O. rhinotracheale* examinados, 19 pertenceram ao sorotipo A, 2 ao sorotipo C e os 6 restantes não puderam ser tipificados com o painel de antisoros disponível (Tabela 1). O valor D para este método de tipificação foi 0,18.

### **Determinação da suscetibilidade a antimicrobianos**

Dois isolados não cresceram em ágar Müller-Hinton e, desta forma, não puderam ser analisados. Conforme demonstrado na Tabela 1, nenhum dos 25 isolados analisados foram resistentes à norfloxacin, doxiciclina, cefalotina, lincomicina e amoxicilina. Dois isolados foram resistentes à neomicina e 18 foram resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima. O valor D para este método de tipificação foi 0,50.

### **SAFLP**

Cada um dos *primers* HI-A, HI-C e HI-G produziu 6 padrões de bandas distintos para os 27 isolados de *O. rhinotracheale* analisados. O perfil da *P. multocida* com os *primers* HI-A e HI-G foi muito distinto daqueles obtidos com os isolados de *O. rhinotracheale*. Os *primer* HI-T para *O. rhinotracheale* e *P. multocida* e HI-C para *P. multocida* produziram fragmentos de baixa resolução e não foram considerados no presente estudo. O número de bandas geradas pelo método SAFLP para cada isolado de *O. rhinotracheale* variou de 2 a 6 com os 3 *primers* analisados, enquanto que para a *P. multocida* foram observadas 3 e 5 bandas com os *primers* HI-A e HI-G, respectivamente.

Vinte e dois isolados geraram um padrão idêntico com cada um dos três *primers* (HI-A, HI-C e HI-G), porém entre os *primers* os padrões gerados foram diferentes. Este padrão foi denominado de A e constituiu o padrão predominante gerado com cada um dos



*primers*. Os outros cinco isolados apresentaram, cada um, um padrão distinto deste predominante, sendo cada padrão (B a F) representado por somente um isolado de *O. rhinotracheale* (Figura 1). Dos 22 isolados que apresentaram padrão predominante A, 19 foram oriundos de aves industriais e 3 de aves não industriais, enquanto que dos 5 isolados que apresentaram perfil distinto, 4 foram obtidos de galinhas não industriais e um foi isolado de frango comercial. Quando a reprodutibilidade da técnica foi avaliada, todos os isolados apresentaram padrões idênticos em ambas análises.

O dendrograma construído após a análise de similaridade variou conforme o *primer* utilizado (Figura 2). Os padrões A e B, obtidos com o *primer* HI-A, apresentaram uma similaridade de 71%, enquanto que os padrões C, D, E e F mostraram menos de 65% de similaridade com os padrões A e B. Os padrões B e C, gerados pelo *primer* HI-C, apresentaram 71% de similaridade, sendo que a similaridade entre todos outros padrões foi menor do que 60%. Os padrões A, B e D, derivados do *primer* HI-G, foram 71% similares, enquanto que os outros padrões apresentaram menos de 60% de similaridade com os padrões A, B e D. Destaca-se a ausência de similaridade entre o padrão F e os demais padrões quando foram utilizados os *primers* HI-C e HI-G e uma similaridade muito baixa com o *primer* HI-A. A *P. multocida* (padrão G) não apresentou similaridade com os padrões de *O. rhinotracheale* gerados pelo *primer* HI-A e foi 4% similar aos outros padrões quando analisada com o *primer* HI-G. O valor D para este método de tipificação foi de 0,34.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que determina a variabilidade genética, antigênica e de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *O. rhinotracheale* do Brasil.

Conforme demonstrado na Tabela 1, houve um predomínio do sorotipo A (70%) entre os isolados analisados, seguido pelos isolados não sorotipificáveis (22%) e por 2 isolados do sorotipo C (7%). A maior prevalência do sorotipo A, observada entre os isolados de galinha, foi similar aos achados em estudos realizados em outros países (van Empel et al., 1997; Odor et al., 1997; Hung & Alvarado, 2001; Cauwerts et al.; 2002, El-Sukhon, et al., 2002; Turan & Ak, 2002). Da mesma forma, 9 isolados de perus foram classificados como sorotipo A e um isolado não foi sorotipificável. Outros autores demonstraram uma maior heterogeneidade de sorotipos entre isolados de perus. Van Empel et al. (1997) obtiveram isolados pertencentes ao sorotipo A, B, C, D, E e F, enquanto Hafez & Sting (1999) encontraram isolados pertencentes ao sorotipo A, B e E. Desta forma, os isolados de *O. rhinotracheale* de perus do Brasil foram mais homogêneos do que os de outros países. Uma explicação pode ser a de que os isolados brasileiros foram procedentes de somente três empresas que adotam o sistema vertical de criação de perus, além disso, o número de isolados analisados foi pequeno, o que pode ter contribuído para a maior homogeneidade observada. Os isolados não sorotipificáveis podem constituir sorotipos ainda não caracterizados, uma vez que os resultados de PCR e SAFLP indicam que eles pertencem à espécie *O. rhinotracheale*.

No teste de suscetibilidade a antimicrobianos, foram testadas as drogas mais utilizadas na avicultura industrial atualmente. Vinte e cinco isolados foram sensíveis à doxiciclina e lincomicina, contrastando com os resultados de Devriese et al. (1995) e

Devriese et al. (2001) que analisaram isolados de *O. rhinotracheale* da Bélgica e constaram que a maioria dos isolados era resistente a estes dois antimicrobianos.

Resistência às quinolonas, principalmente enrofloxacina e flumequina, foi relatada por diversos pesquisadores (Devriese et al., 1995; Zorman-Rojs et al., 2000; Devriese et al., 2001; van Veen et al., 2001; Malik et al., 2003; Soriano et al., 2003), sugerindo-se uma freqüente resistência da *O. rhinotracheale* a estas drogas antimicrobianas. Já no presente trabalho, todos os isolados foram sensíveis à norfloxacina, outro antimicrobiano do grupo das quinolonas.

Todos os isolados analisados também foram sensíveis aos  $\beta$ -lactâmicos testados. Este resultado está de acordo com estudos de outros pesquisadores em que a *O. rhinotracheale* foi suscetível aos  $\beta$ -lactâmicos (de Rosa et al., 1996; Back et al., 1997; Zorman-Rojs et al., 2000; El-Sukhon et al., 2002). Contudo, Devriese et al. (1995), Devriese et al. (2001) e van Veen et al. (2001) observaram um grande número de isolados resistentes a este grupo de antimicrobianos, sendo a resistência atribuída à enzima  $\beta$ -lactamase presente nestes isolados.

O padrão de sensibilidade dos isolados brasileiros obtido com a neomicina foi similar ao obtido por Back et al. (1997), em que a maioria de isolados dos Estados Unidos foram sensíveis a este antimicrobiano. Isolados de *O. rhinotracheale* da Jordânia, entretanto, apresentaram um alto nível de resistência (86%) quando testados frente à neomicina (El-Sukhon et al., 2002).

A maioria dos isolados foi resistente a sulfametoxazol/trimetoprima, sendo esta tendência observada em outros países (Devriese et al., 1995; El-Sukhon et al., 2002). A *O. rhinotracheale* também foi resistente a outros antimicrobianos do grupo das sulfonamidas

associadas com trimetoprima (Back et al. 1997; van Veen et al. 2001; Malik et al., 2003). Sugere-se que a alta resistência dos isolados brasileiros frente à sulfametoxazol/trimetoprima seja uma conseqüência da ampla utilização das sulfonamidas na prevenção de coccidiose em criações comerciais no Brasil até alguns anos atrás. Já a menor resistência observada frente aos outros antimicrobianos pode indicar o uso mais criterioso destes antimicrobianos mais recentemente.

Foi possível tipificar os 27 isolados de *O. rhinotracheale* pelo método de SAFLP. A caracterização genotípica destes isolados demonstrou que existem pelo menos 6 padrões diferentes em isolados de *O. rhinotracheale* no Brasil, sendo a maior parte desta variabilidade encontrada em galinhas de criação não industrial. Esta variabilidade pôde ser observada com os isolados de aves não industriais da empresa F, que apresentaram os padrões A e B de SAFLP, e isolados oriundos da empresa H, que corresponderam aos perfis C, D e E. Amonsin et al. (1997) demonstraram que amostras de *O. rhinotracheale* isoladas de aves silvestres apresentavam uma maior variação genotípica do que isolados de aves domésticas. Em nosso estudo, observou-se que as instalações dos entrepostos comerciais das empresas F e H eram impróprias e permitiam um contato muito próximo com aves silvestres, sugerindo-se que esta poderia ser uma fonte das amostras de *O. rhinotracheale* genotipicamente diferentes. Outro fator a ser levado em consideração, são as práticas de manejo e medidas de biossegurança inadequadas que eram adotadas nestes estabelecimentos, permitindo o contato entre aves de diferentes origens, idades e estado sanitário. Nestas condições, a população de microrganismos pode ser muito grande e variada, observando-se a presença de diferentes espécies de patógenos, bem como uma grande diversidade dentro da mesma espécie microbiana.

Por outro lado, o predomínio de um padrão idêntico entre isolados de *O. rhinotracheale* de aves comerciais poderia ser atribuída à expansão clonal de um isolado que pode ter se difundido em toda a cadeia avícola do Brasil. Somente um isolado de galinhas comerciais apresentou um padrão distinto dos demais isolados, possuindo pequena ou nenhuma similaridade com os outros padrões, embora pertença ao sorotipo e padrão de resistência a antimicrobianos predominantes. Em um estudo anterior, a caracterização bioquímica deste isolado resultou em dois açúcares e um aminoácido diferentes da amostra padrão, porém o resultado de seqüenciamento do fragmento de amplificação foi idêntico às seqüências de *O. rhinotracheale* publicadas (Canal et al., 2005). Desta forma, é possível que este isolado constitua uma outra linhagem dentro do gênero *Ornithobacterium*.

Leroy-sétrin et al. (1998) analisaram isolados de *O. rhinotracheale* da França através de *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e também observaram diferenças no perfil genotípico desta bactéria. Em contrapartida, Koga & Zavaleta (2005) demonstraram por rep-PCR uma alta similaridade entre 25 isolados de *O. rhinotracheale* de aves comerciais no Peru provenientes de diferentes hospedeiros e origens geográficas.

Dos isolados com padrão de SAFLP diferente do predominante (A), dois não puderam ser sorotipificados, dois pertenciam ao sorotipo C e um ao sorotipo A. Dezoito isolados que apresentaram padrão molecular idêntico (A), foram identificados como sorotipo A e 4 não puderam ser sorotipificados.

Todos os isolados resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima pertenciam ao padrão A de SAFLP, com exceção de um isolado que foi classificado como padrão F. O isolado resistente à neomicina constituiu o padrão D de SAFLP, enquanto que o isolado resistente à neomicina e sulfametoxazol/trimetoprima, foi representado pelo padrão A de SAFLP.

Conclui-se que o sorotipo A de *O. rhinotracheale* é predominante em criações comerciais no Brasil. Alguns isolados não sorotipificáveis, provavelmente, constituam sorotipos ainda não caracterizados. Os isolados brasileiros foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados. O poder discriminatório do teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi maior do que a sorotipificação e o método de SAFLP, porém o método de SAFLP gerou um maior número de padrões, sugerindo que ele possa ser utilizado como ferramenta em estudos epidemiológicos.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado fornecida a M. Macagnan e à empresa Intervet International pela realização da sorotipificação.

## REFERÊNCIAS

- Amonsin, A., Wellehan, J.F.X., Ling-Ling, L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R. A. & Kapur, V. (1997). Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 2894-2898.
- Arns, C.W., Hafez, H.M., Yano, T., Monteiro, M.C.G.B., Celestino Alves, M., Domingues, H.G., Coswig, L.T. (1998). *Ornithobacterium rhinotracheale*: Detecção sorológica em aves matrizes e frangos de corte. *Proceedings of Conferência Apinco 1998 de Ciência e Tecnologia Avícolas*, Campinas, Brasil, pp. 55.
- Back, A., Nagaraja, K.V. & Halvorson, D. (1996). Preliminary studies on *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection in turkeys. *Proceedings of The Turkey ORT Scientific Symposium*, Minneapolis, Estados Unidos, pp. 29-31.
- Back, A., Sprenger, S., Rajashekara, G., Halvorson, D.A. & Nagaraja, K.V. (1997). Antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from different geographic locations. *Proceedings of 48th North Central Avian Disease Conference*, pp. 22-24.
- Canal, C.W., Leão, J.A., Ferreira, D.J., Macagnan, M., Salle, C.T.P., Back, A. (2003a). Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers and breeders in Southern Brazil. *Avian Diseases*. 47, 163-169.
- Canal, C.W., Leão, J.A., Rocha, S.L.S., Macagnan, M., Lima-Rosa, C.A.V., Oliveira, S.D. & Back, A. (2005). Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. *Research in Veterinary Science*. 78, 225-230.
- Canal, C.W., Rocha, S.L.S., Leão, J.A., Fallavena, L.C.B., Oliveira, S.D. & Beltrão, N. (2003b). Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Ciência Rural*. 33, 377-379.
- Cauwerts, K., de Herdt, P., Haesebrouck, F., Vervloesem, J. & Ducatelle, R. (2002). The effect of *Ornithobacterium rhinotracheale* vaccination of broiler breeder chickens on the performance of their progeny. *Avian Pathology*. 31, 619-624.
- Chin, R.P., van Empel, P. & Hafez, H.M. (2003). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R. & Swayne, D.E. (2003). *Diseases of Poultry*. 11th ed. (pp. 683-690). Ames: Iowa State University.
- de Rosa, M., Droual, R., Chin, R.P., Shivaprasad, H.L. & Walker, R.L. (1996). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders. *Avian Diseases*. 40, 865-874.

- Devriese, L.A., Hommeez, J., Vandamme, P., Kersters, K. & Haesebrouck, F. (1995). In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *The Veterinary Record*. 137, 435-436.
- Devriese, L.A., de Herdt, P. & Haesebrouck, F. (2001). Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. *Avian Pathology*. 30, 197-200.
- El-Sukhon, S.N., Musa, A. & Al-Attar, M. (2002). Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in Northern and Middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium*. *Avian Diseases*. 46, 605-612.
- Gibson, J.R., Slater, E., Xerry, J., Tompkins, D.S. & Owen, R.J. (1998). Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 2580-2585.
- Hafez, M.H. & Sting, R. (1999). Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. *Avian Diseases*. 43, 1-7.
- Hung, A.L. & Alvarado, A. (2001). Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Diseases*. 45, 999-1005.
- Hunter, P.R. & Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26, 2465-2466.
- Koga, Y. & Zavaleta, A.I. (2005). Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian Diseases*. 49, 108-111.
- Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Thénaïsy, K. & Chalus-Dancla, E. (1998) Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 189-193.
- Malik, Y.S., Olsen, K., Kumar, K. & Goyal, S.M. (2003). In vitro antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from Minnesota turkeys during 1996-2002. *Avian Diseases*. 47, 588-593.
- NCCLS (2001). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- Odor, E.M., Salem, M., Pope, C.R., Sample, B., Primm, M., Vance, K. & Murphy, M. (1997). Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva Peninsula. *Avian Diseases*. 41, 257-260.



Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Commonly used techniques molecular cloning. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. (pp. E3-E4). 3v. Appendix F. Cold Spring Harbour Laboratory.

Soriano, V.E., Vera, N.A., Salado, C.R., Fernández, R.P. & Blackall, P.J. (2003). In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Diseases*. 47, 476-480.

Turan, N. & Ak, S. (2002). Investigation of the presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Turkey and determination of the seroprevalence of the infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases*. 46, 442-446.

Vandamme, P., Segers, P., Vancanney, M., van Hove, K., Mutters, R., Hommez, J., Dewhirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen E., Devrise, L.A., Bisgaard, M., Hinz, K.H. & Mannheim, W. (1994). Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 24-37.

van Empel, P., van den Bosch, H., Loeffen, P. & Storm, P. (1997). Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 418-421.

van Veen, L., Hartman, E. & Fabri, T. (2001). In vitro antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. *The Veterinary Record*. 149, 611-613.

Zorman-Rojs, O.; Zdovc I., Bencina, D. & Mrzel, I. (2000). Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*. 44, 1017-1022.

Tabela 1: Isolados de *O. rhinotracheale* estudados e resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos, sorotipificação e SAFLP

Nº do isolado	Ano do isolamento	Fonte	Região	Empresa	Resistência antimicrobiana	Sorotipo	SAFLP <sup>A</sup>
1	2001	Peru	Sul	A	Sut <sup>B</sup>	A	A
2	2001	Frango	Sul	B	Sut	A	F
3	2001	Frango	Sul	B	Sut	A	A
4	2001	Frango	Sul	C	Sut	A	A
5	2001	Frango	Sul	D	Sut	A	A
6	2001	Peru	Sul	A	Sut	A	A
7	2001	Peru	Sul	A	Sut	A	A
8	2001	Peru	Sul	A	Sut	A	A
9	2002	Peru	Sul	NI <sup>E</sup>	Sut	NS <sup>F</sup>	A
10	2002	Peru	Sul	E	Sut	A	A
11	2003	Peru	Sul	E	Sut	A	A
12	2003	Peru	Sul	E	Sut	A	A
13	2003	Peru	Sul	E	NR	A	A
14	2005	Peru	Sul	A	Sut	A	A
15	2005	NI	NI	NI	Sut	A	A
16	2005	NI	NI	NI	Sut	NS	A
17	2005	Caipira <sup>G</sup>	Sul	F	Sut, Neo <sup>C</sup>	A	A
18	2005	Caipira	Sul	F	- <sup>D</sup>	A	A
19	2005	Caipira	Sul	F	NA <sup>H</sup>	NS	B
20	2005	Caipira	Sul	G	Sut	NS	A
21	2005	Caipira	Sul	H	-	C	C
22	2005	Caipira	Sul	H	Neo	C	D
23	2005	Caipira	Sul	H	-	NS	E
24	2005	Frango	Nordeste	I	NA	NS	A
25	2005	Frango	Nordeste	I	Sut	A	A
26	2005	Poedeira	Sudeste	J	-	A	A
27	2005	Poedeira	Sudeste	L	-	A	A

<sup>A</sup> Padrão de SAFLP obtido com os 3 *primers* analisados

<sup>B</sup> Sut= sulfametoxazol/trimetoprima

<sup>C</sup> Neo= neomicina

<sup>D</sup> - = não apresentou resistência aos antimicrobianos testados

<sup>E</sup> NI= não informado

<sup>F</sup> NS= não sorotipificável

<sup>G</sup> Caipira= galinha de criação não industrial

<sup>H</sup> NA= não analisado

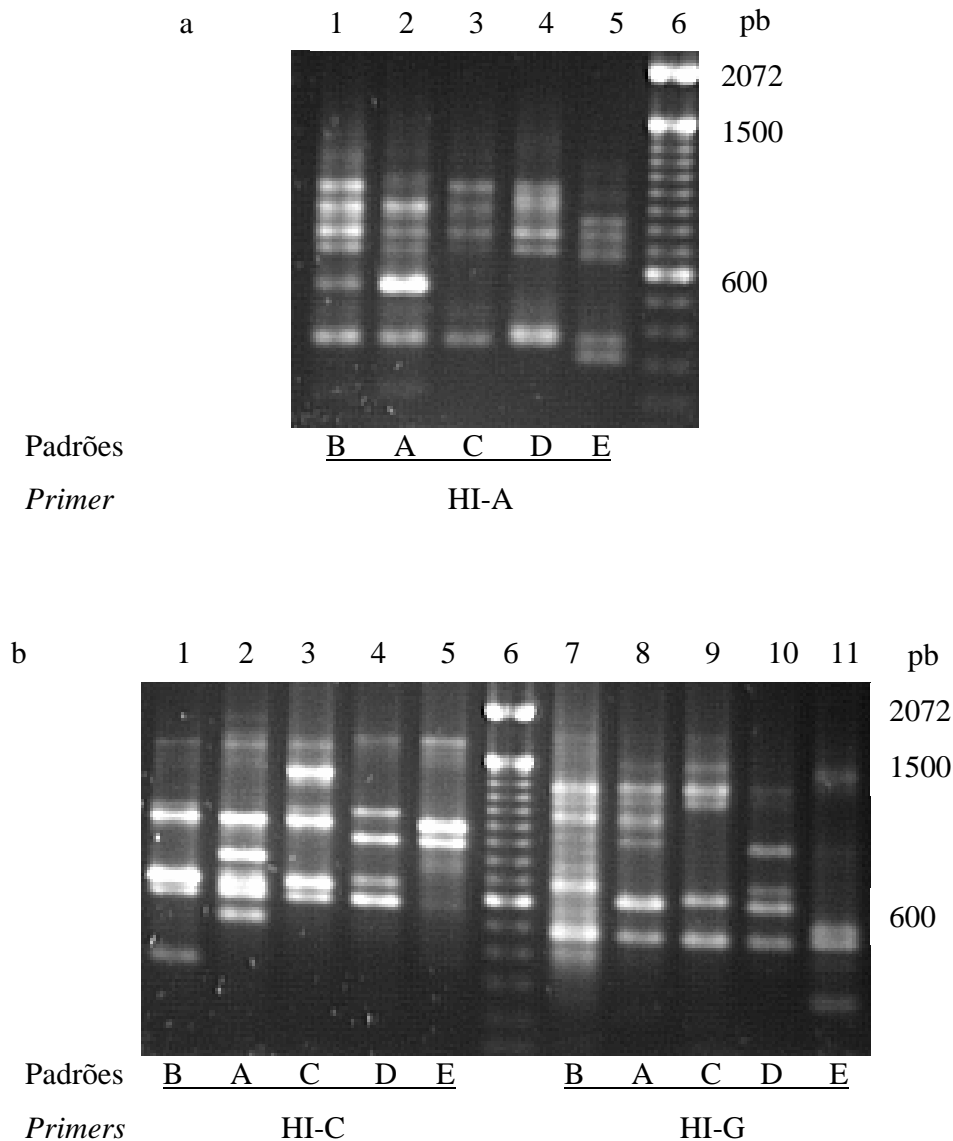


Figura 1. Padrões de bandas de SAFLP gerados para 26 isolados de *O. rhinotracheale*. (a) Padrões obtidos com o *primer* HI-A. Linha 1: isolado 19; linha 2: isolados 1, 3-18, 20, 24-27; linha 3: isolado 21; linha 4: isolado 22; linha 5: isolado 23; linha 6: marcador molecular (100 pb; Invitrogen). (b) Padrões obtidos com os *primers* HI-C (linhas 1-5) e HI-G (linhas 7-11). Linha 1: isolado 19; linha 2: isolados 1, 3-18, 20, 24-27; linha 3: isolado 21; linha 4: isolado 22; linha 5: isolado 23; linha 6: marcador molecular; linha 7: isolado 19; linha 8: isolados 1, 3-18, 20, 24-27; linha 9: isolado 21; linha 10: isolado 22; linha 11: isolado 23.

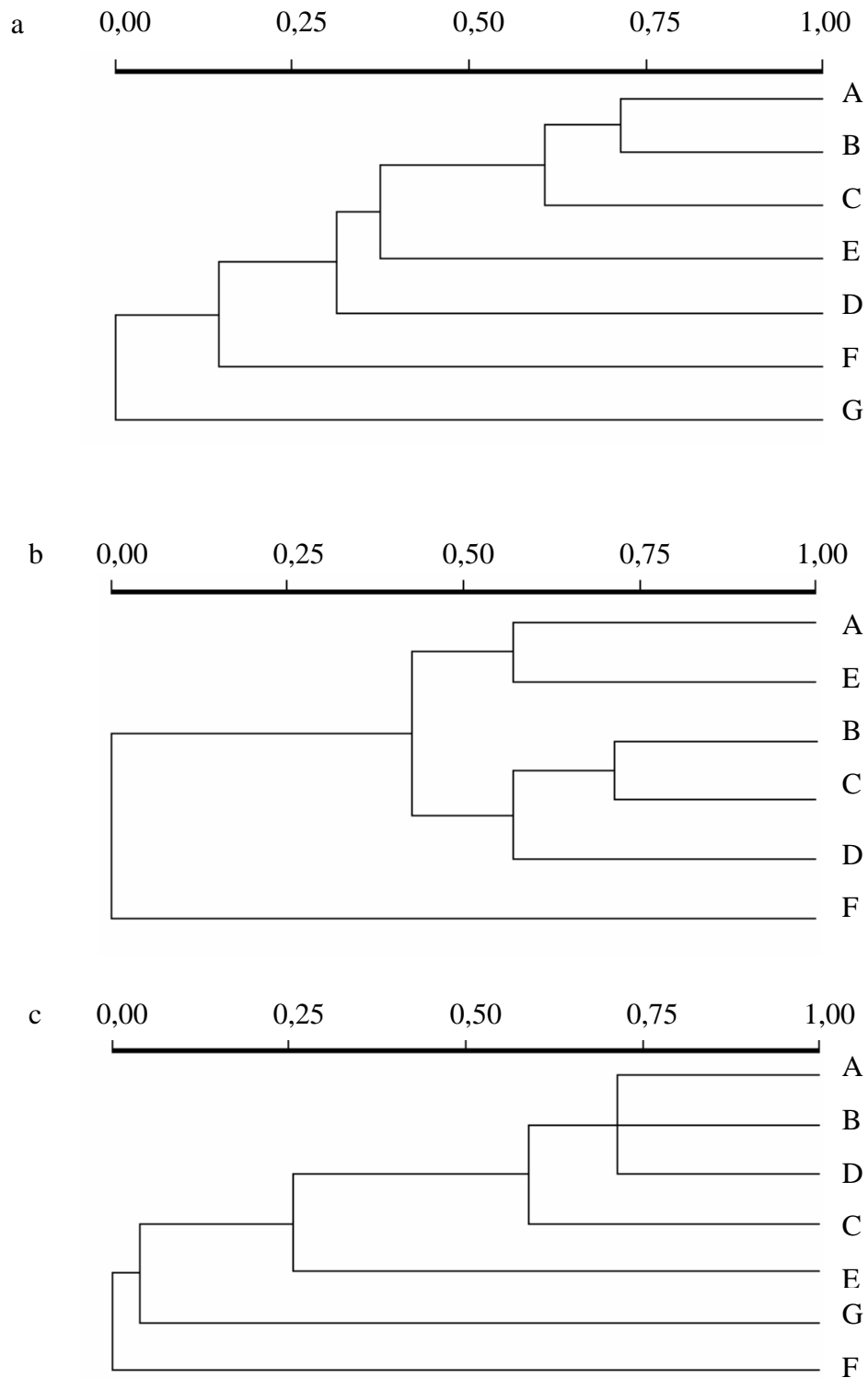


Figura 2. Dendrogramas resultantes dos perfis de SAFLP de *O. rhinotracheale* e *P. multocida* utilizando os *primers* HI-A (a), HI-C (b) e HI-G (c). A denominação de cada perfil é dada no eixo vertical. O número no eixo horizontal indica a porcentagem de similaridade, conforme determinado pelo coeficiente Jaccard e UPGMA *clustering*.

#### 4. CONCLUSÕES

- O sorotipo A de *O. rhinotracheale* foi predominante entre isolados de galinhas e perus analisados;
- Os isolados de *O. rhinotracheale* analisados foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados;
- Existem pelo menos 6 padrões genotípicos distintos de *O. rhinotracheale* no Brasil;
- A maioria dos isolados de *O. rhinotracheale* apresentou um padrão predominante de SAFLP;
- Isolados de *O. rhinotracheale* de aves de criação não industrial apresentaram uma maior variabilidade genética do que isolados de aves industriais;
- A determinação da sensibilidade a antimicrobianos foi a técnica mais discriminatória, porém o método de SAFLP gerou um número maior de padrões, sugerindo-se que possa ser utilizado como ferramenta em estudos epidemiológicos.

## REFERÊNCIAS

- AMONSIN, A.; WELLEHAN, J.F.X.; LING-LING, 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.
- ARNS, C.W.; HAFEZ, H.M.; YANO, T.; MONTEIRO, M.C.G.B.; CELESTINO ALVES, M.; DOMINGUES, H.G.; COSWIG, L.T. *Ornithobacterium rhinotracheale*: Detecção sorológica em aves matrizes e frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 1998 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas: Facta, 1998. p. 55.
- ABEF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2006.
- BACK, A.; SPRENGER, S.; RAJASHEKARA, G.; HALVORSON, D.A.; NAGARAJA, K.V. Antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from different geographic locations. In: NORTH CENTRAL AVIAN DISEASE CONFERENCE, 48, 1997. **Anais**. Des Moines, Iowa, 1997. p. 22-24.
- BACK, A.; NAGARAJA, K.V.; HALVORSON, D. Preliminary studies on *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection in turkeys. In: THE TURKEY ORT SCIENTIFIC SYMPOSIUM, 1996, Minneapolis. **Roche Professional Service Series**, 1996. p. 29-31.
- BACK, A.; RAJASHEKARA, G.; JEREMIAH, R.B.; HALVORSON, D.A.; NAGARAJA, K.V. Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys. **The Veterinary Record**, v. 143, n. 11, p. 52-53, 1998.
- BACK, A. Ornitobacteriose. **Manual de doença das aves**. Coluna do saber, 2004. p. 55-56
- BLEARS, M.J.; DE GRANDIS, S.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 99-114, 1998.
- CANAL, C.W.; LEÃO, J.A.; FERREIRA, D.J.; MACAGNAN, M.; SALLE, C.T.P.; BACK, A. Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers and breeders in Southern Brazil. **Avian Diseases**, v. 47, p. 163-169, 2003a.
- CANAL, C.W.; ROCHA, S.L.S.; LEÃO, J.A.; FALLAVENA, L.C.B.; OLIVEIRA, S.D.; BELTRÃO, N. Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 377-379, 2003b.
- CANAL, C.W.; LEÃO, J.A.; ROCHA, S.L.S.; MACAGNAN, M.; LIMA-ROSA, C.A.V.; OLIVEIRA, S.D.; BACK, A. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 225-230, 2005.

CAUWERTS, K.; DE HERDT, P.; HAESEBROUCK, F.; VERVLOESEM, J.; DUCATELLE, R. The effect of *Ornithobacterium rhinotracheale* vaccination of broiler breeder chickens on the performance of their progeny. **Avian Pathology**, v. 31, p. 619-624, 2002.

CHARLTON, B.R.; CHANNING-SANTIAGO, S.E.; BICKFORD, A.A.; CARDONA, C.J.; CHIN, R.P.; COOPER, G.L.; DROUAL, R.; JEFFREY, J.S.; METEYER, C.U.; SHIVAPRASAD, H.L.; WALKER, R.L. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 47-51, 1993.

CHIN, R.P.; VAN EMPEL, P.; HAFEZ, H.M. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. (Eds.). **Diseases of Poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 683-690.

DE ROSA, M.; DROUAL, R.; CHIN, R.P.; SHIVAPRASAD, H.L.; WALKER, R.L. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders. **Avian Diseases**, v. 40, p. 865-874, 1996.

DEVRIESE, L.A.; HOMMEZ, J.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; HAESEBROUCK, F. In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. **The Veterinary Record**, v. 137, n. 21, p. 435-436, 1995.

DEVRIESE, L.A.; DE HERDT, P.; HAESEBROUCK, F. Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 30, p. 197-200, 2001.

EL-SUKHON, S.N.; MUSA, A.; AL-ATTAR, M. Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in Northern and Middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium*. **Avian Diseases**, v. 46, p. 605-612, 2002.

GIBSON, J.R.; SLATER, E.; XERRY, J.; TOMPKINS, D.S.; OWEN, R.J. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2580-2585, 1998.

HAFEZ, H.M. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, p. 114-118, 2002.

HAFEZ, H.M. Current status on the laboratory diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" in poultry. **Berliner-und-Munchener-Tierarztliche-Wochenschrift**, v. 111, p. 143-145, 1998.

HAFEZ, M.H.; STING, R. Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. **Avian Diseases**, v. 43, p. 1-7, 1999.

HAFEZ, H.M.; STING, R. Serological surveillance on *Ornithobacterium rhinotracheale* in poultry flocks using self-made ELISA. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 45, 1996, Cancun, p.163-164, 1996.

HINZ, K.H.; BLOME, C.; RYLL, M. Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. **The Veterinary Record**, v. 135, n. 3, p. 233-234, 1994.

HUNG, A.L.; ALVARADO, A. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. **Avian Diseases**, v. 45, p. 999-1005, 2001.

JOUBERT, P.; HIGGINS, R.; LAPERLE, A.; MIKAELIAN, I.; VENNE, D.; SILIM, A. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. **Avian Diseases**, v. 43, p. 622-626, 1999.

KOGA, Y.; ZAVALETA, A.I. Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. **Avian Diseases**, v. 49, p. 108-111, 2005.

LEÃO, J.A. **Isolamento e prevalência de *Ornithobacterium rhinotracheale* em matrizes e frangos de corte na região Sul do Brasil**. 2002. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

LEROY-SÉTRIN, S.; FLAUJAC, G.; THÉNAISY, K.; CHASLUS-DANCLA, E. Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 189-193, 1998.

LOPES, V.C.; VELAYUDHAN, B.; HALVORSON, D.A.; NAGARAJA, K.V. Survival of *Ornithobacterium rhinotracheale* in sterilized poultry litter. **Avian Diseases**, v. 46, p. 1011-1014, 2002a.

LOPES, V.; BACK, A.; HALVORSON, D.A.; NAGARAJA, K.V. Minimization of pathologic changes in *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys by temperature-sensitive strain. **Avian Diseases**, v. 46, p. 177-185, 2002b.

MALIK, Y.S.; OLSEN, K.; KUMAR, K.; GOYAL, S.M. In vitro antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from Minnesota turkeys during 1996-2002. **Avian Diseases**, v. 47, p. 588-593, 2003.

MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A2. Wayne, PA, USA, 2001.

ODOR, E.M.; SALEM, M.; POPE, C.R.; PRIMM, M.; VANCE, K.; MURPHY, M. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva Peninsula. **Avian Diseases**, v. 41, p. 257-260, 1997.

ROEPKE, D.C.; BACK, A.; SHAW, D.P.; NAGARAJA, K.V.; SPRENGER, S.J.; HALVORSON, D.A. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the Upper Midwest. **Avian Diseases**, v. 42, p. 219-221, 1998.



RYLL, M.; HINZ, K.H.; SALISCH, H.; KRUSE, W. Pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale* for turkey poults under experimental conditions. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 6, p. 19, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Commonly used techniques molecular cloning. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbour Laboratory, 1989. v. 3, appendix F, p. E3-E4.

SAKAI, E.; TOKUYMA, Y.; NONAKA, F.; OHISHI, S.; ISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; TANENO, A. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. **The Veterinary Record**, v. 146, n. 17, p. 502-504, 2000.

SCHUIJFFEL, D.F.; VAN EMPEL, P.C.M.; SEGERS, R.P.A.M., VAN PUTTEN, J.P.M.; NUIJTEN, P.J.M. Vaccine potential of recombinant *Ornithobacterium rhinotracheale* antigens. **Vaccine**, In press, 2005.

SORIANO, V.E.; LONGINOS, M.G.; NAVARRETE, P.G.; FERNÁNDEZ, R.P. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. **Avian Diseases**, v. 46, p. 686-690, 2002.

SOOD, S.; PETERS, T.; WARD, L.R.; THRELFALL, J. Combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 3, p. 154-161, 2002.

SORIANO, V.E.; VERA, N.A.; SALADO, C.R.; FERNÁNDEZ, R.P.; BLACKALL, P.J. In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. **Avian Diseases**, v. 47, p. 476-480, 2003.

SPRENGER, S.J.; HALVORSON, D.A.; NAGARAJA, K.V.; SPASOJEVIC, R.; DUTTON, R.S.; SHAW, D.P. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying-type chickens. **Avian Diseases**, v. 44, p. 725-729, 2000.

SPRENGER, S.J.; BACK, A.; SHAW, D.P.; NAGARAJA, K.V.; ROEPKE, D.C.; HALVORSON, D.A. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease. **Avian Diseases**, v. 42, p. 154-161, 1998.

TRAVERS, A.F.; CEOTZEE, L.; GUMMOW, B. Pathogenicity differences between South African isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 197-207, 1996.

TURAN, N.; AK, S. Investigation of the presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Turkey and determination of the seroprevalance of the infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Diseases**, v. 46, p. 442-446, 2002.

VALSANGIACOMO, C.; BAGGI, F.; GAIA, V.; BALMELLI, T.; PEDUZZI, R.; PIFFARETTI, J.C. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1716-1719, 1995.

VANDAMME, P.; SEGERS, P.; VANCANNEY, M.; VAN HOVE, K.; MUTTERS, R.; HOMMEZ, J.; DEWHIRST, F.; PASTER, B.; KERSTERS, K.; FALSEN E.;

DEVRISE, L.A.; BISGAARD, M.; HINZ, K.H.; MANNHEIM, W. Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 1, p. 24-37, 1994.

VAN EMPEL, P.; HAFEZ, H.M. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. **Avian Pathology**, v. 28, n. 3, p. 217-227, 1999.

VAN EMPEL, P.; VAN DEN BOSCH, H.; LOEFFEN, P.; STORM, P. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 418-421, 1997.

VAN EMPEL, P.; SAVELKOUL, P.; SEGERS, R.; STOOF, J.; LOEFFEN, P.; VAN DEN BOSCH, H. Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Ornithobacterium rhinotracheale*. Utrecht: Universiteit Utrecht, 1998a, cap. 3B, p. 37-48.

VAN EMPEL, P.; VAN DEN BOSCH, H.; STORM, P. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection by egg transmission. *Ornithobacterium rhinotracheale*. Utrecht: Universiteit Utrecht, 1998b, cap. 4A, p. 49-56.

VAN EMPEL, P.; VAN DEN BOSCH, H.; GOOVAERTS, D.; STORM, P. Experimental infection in turkey and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Avian Diseases**, v. 40, p. 858-864, 1996.

VAN EMPEL, P.C.M.; VRIJENHOEK, M.; GOOVAERTS, D.; VAN DEN BOSCH, H. Immunohistochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 28, n. 2, p. 187-193, 1999.

VAN EMPEL, P.; VAN DEN BOSCH, H. Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. **Avian Diseases**, v. 42, p. 572-578, 1998.

VAN VEEN, L.; GRUYS, E.; FRIK, K.; VAN EMPEL, P. Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. **The Veterinary Record**, v. 147, n. 7, p. 422-423, 2000a.

VAN VEEN, L.; VAN EMPEL, P.; FABRI, T. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. **Avian Diseases**, v. 44, p. 896-900, 2000b.

VAN VEEN, L.; HARTMAN, E.; FABRI, T. In vitro antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. **The Veterinary Record**, v. 149, n. 17, p. 611-613, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

ZORMAN-ROJS, O.; ZDOVC, I.; BENCINA, D.; MRZEL, I. Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v. 44, p. 1017-1022, 2000.