CLEISE RIBEIRO GOMES

Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Bordetella avium* através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

São Paulo

2011

CLEISE RIBEIRO GOMES

Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Bordetella avium* através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutora em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
29/7/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2489
FMVZ

Gomes, Cleise Ribeiro
Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Bordetella avium* através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) / Cleise Ribeiro Gomes. -- 2011.
60 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. *Bordetella avium*. 2. PFGE. 3. AFLP. 4. PCR. 5. Resistência antimicrobiana. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Detecção de agentes bacterianos envolvidos nos quadros de aerossaculite em perus através da reação em cadeia pela polimerase.", protocolado sob o nº1802/2009, utilizando 200 (duzentos) perus, sob a responsabilidade da Profa Dra Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/01/2010.

We certify that the Research "Detection of bacterial agents related to airscculitis in turkeys through polymerase chain reaction", protocol number 1802/2009, utilizing 200 (two hundred) turkeys, under the responsibility Profa Dra Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 01/20/2010.

São Paulo, 21 de janeiro de 2010

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

1934 | 2009 USP FMVZ 75

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOMES, Cleise Ribeiro

Título: Isolamento e caracterização genotípica de cepas *Bordetella avium* através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de amplificados (AFLP).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutora em Ciências

Data: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Profª. Drª. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____Julgamento: _____

Profª. Drª. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Profª. Drª. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Profª. Drª. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Profª. Drª. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, que tanto amo e a qual tudo devo!

À Deus, que ilumina meu caminho e que sempre me acompanha.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo seu amor, dedicação, compreensão e, pelo seu incentivo em toda minha vida.

Ao meu esposo que, apesar da distância, sempre esteve ao meu lado.

Aos meus irmãos pelo carinho e compreensão.

Aos meus tios pelo amparo, dedicação e incentivo.

A toda minha família pelo carinho.

À minha orientadora Profª. Drª. Andrea Micke Moreno que me auxilou em todos os momentos necessários e apoiou minhas idéias durante todo o doutorado e, a tudo que me ensinou durante estes oito anos de convivência.

Aos amigos de laboratório Thais S. P. Ferreira, Débora D. S. de Gobbi, Maria Roberta Felizardo, Daniele C. Raimundo, Renata Paixão, Luciane S. Zucon, Cristina Roman Amigo, Ana Paula Santos da Silva, Marina Moreno, Vasco Túlio de Moura Gomes, Nayla Fernanda de F. Batista, Sergio de M. N. Teixeira, Tereza Abujamra,Tania Alen Coutinho, Pedro Filsner, Alexandre A. Sanches, Sandra A. Sanches, Jucélia de Jesus Pereira, Maria José Louro, pela ajuda, convivência e companheirismo.

Aos amigos da secretaria do departamento Ana Virgínia P. A. Prado, Maria Cristina Paick, Danival L. Moreira e Tania Delonero que me ajudaram em muitos momentos durante toda a pós-graduação.

Ao professor Antônio J. P. Ferreira pela ajuda sempre que lhe foi solicitada.

Ao professor Paulo Eduardo Brandão pela disposição em esclarecer dúvidas e amizade.

Aos funcionários, veterinários e proprietários dos abatedouros em que foram realizadas as coletas.

A todos os estagiários que passaram pelo laboratório enquanto este projeto foi realizado, pois todos tiveram a sua colaboração.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de doutorado.

À Universidade de São Paulo pelas condições de trabalho proporcionadas e contribuição à minha formação acadêmica.

Ao Sr. Henri Berghs da empresa Fairport Ltda pela autorização de uso do programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths) para análise dos resultados obtidos neste estudo.

RESUMO

RESUMO

GOMES, C. R. **Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Bordetella avium* através da eletroforese campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP).**[Isolation and genotypic characterization of *Bordetella avium* strains by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP)]. 2011. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A *Bordetella avium* é o agente etiológico da bordetelose aviária, uma doença altamente contagiosa que afeta o trato respiratório superior das aves. *B. avium* adere-se preferencialmente às células do epitélio ciliado traqueal, promovendo inflamação e deformação da mucosa respiratória. As infecções do trato respiratório das aves resultam em grandes prejuízos para toda indústria avícola, desta forma, o presente estudo teve como objetivo a caracterização genotípica e de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *B. avium* provenientes de perus com histórico de aerossaculite. Dentre os 300 animais examinados, isolou-se *B. avium* de 13 aves e foram selecionadas 20 cepas do agente para os estudos posteriores. Através do antibiograma realizado pela técnica de disco difusão observou-se um alto número de cepas resistentes aos antimicrobianos beta lactâmicos (amoxacilina, ampicilina, penicilina e ceftiofur), assim como para lincomicina, sulfonamidas e combinação sulfonamidas/trimetoprima (cotrimoxazol) e uma grande heterogeneidade resultando em 15 perfis distintos. Os antimicrobianos com maiores níveis de sensibilidade foram o florfenicol, seguidos pelas quinolonas, doxiciclina e pelas tetraciclinas. Todas as cepas foram caracterizadas através da PFGE e do AFLP, apresentando 15 pulsotipos e 16 perfis genotípicos respectivamente. Os métodos fenotípicos e genotípicos apresentaram capacidade discriminatória semelhante e revelaram uma grande diversidade dentre os isolados analisados.

Palavras-chave: *Bordetella avium*. PFGE. AFLP. PCR. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

ABSTRACT

GOMES, C. R. **Isolation and genotypic characterization of *Bordetella avium* strains by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP)**[Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Bordetella avium* através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)]. 2011. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Bordetella avium is the etiologic agent of avian bordetellosis, a highly contagious disease that affects the upper respiratory tract of birds. *B. avium* adheres preferentially to ciliated tracheal epithelial cells, promoting inflammation and deformation of the respiratory mucosa. Infections of the respiratory tract of birds resulting in large losses for the entire poultry industry in this way, this study aimed to characterize genotypic and antimicrobial susceptibility of isolates of *B. avium* from turkeys with a history of Airsacculitis. Among the 300 animals examined, *B. avium* was isolated from 13 turkeys and 20 strains were selected for further studies. Through the antibiogram performed by disk diffusion technique was observed a high number of strains resistant to beta-lactamic antibiotics (amoxicillin, ampicillin, penicillin and ceftiofur), as well as, lincomycin, sulfonamides and sulfonamide combination/ trimethoprim (cotrimoxazole) and a high level of heterogeneity resulting in 15 different profiles. The antimicrobials with higher levels of sensitivity were florfenicol, followed by quinolones, doxycycline and tetracycline. All strains were characterized through to PFGE and AFLP, presenting 15 pulsotypes and 16 genetic profiles, respectively. Phenotypic and genotypic methods showed similar discriminatory capacity and presented a high diversity among isolates examined

Keywords: *Bordetella avium*. PFGE. AFLP. Antimicrobial susceptibility.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**

2 REVISÃO DE LITERATURA **19**

2.1 HISTÓRICO **19**

2.2 INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO **19**

2.3 ETIOLOGIA **20**

2.3.1 Morfologia e Crescimento **22**

2.4 RESISTÊNCIA A AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS **23**

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA **23**

2.6 VIAS DE TRANSMISSÃO E PERÍODO DE INCUBAÇÃO **24**

2.7 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES **24**

2.8 PATOGENIA **25**

2.9 DIAGNÓSTICO **26**

2.10 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO AGENTE **27**

2.11 TRATAMENTO E CONTROLE **28**

3 OBJETIVOS **30**

4 MATERIAL E MÉTODO **32**

4.1 AMOSTRAS **32**

4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO **32**

4.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA **32**

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA **36**

4.4.1 Amplificação do DNA (PCR) **36**

4.4.2 Detecção do produto de amplificação **37**

4.5 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE) **37**

4.6 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS **38**

4.6.1 Detecção do produto de amplificação **39**

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO **40**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **42**

6 CONCLUSÃO **53**

REFERÊNCIAS **55**

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A estrutura do sistema respiratório em aves é muito diferente da dos mamíferos, primariamente porque aves têm sacos aéreos – estruturas de paredes finas pelas quais o ar inspirado aos pulmões. O sistema de sacos aéreos é muito amplo, preenchendo todos os espaços vazios das cavidades torácica e abdominal. Os sacos aéreos são muito suscetíveis a danos e respondem a isso tornando-se mais espessos, tanto por infiltrados de células inflamatórias quanto pela presença de exudato. Macroscopicamente, o exsudato aparece como material branco, com vesículas, ou como material amarelado, viscoso, dependendo do tempo decorrido desde o início da resposta inflamatória. Esta resposta dos sacos aéreos ao dano é essencialmente a mesma, independente da causa. Por isso é impossível determinar com precisão a etiologia da aerossaculite apenas pela observação das características macroscópicas das lesões nos sacos aéreos (MACARI, 1994).

Um dos sistemas de defesa natural mais importante que a ave tem contra as doenças respiratórias é o sistema mucociliar das vias aéreas. Esse consiste em milhões de minúsculos cílios ou projeções semelhantes a dedos, em constante movimento para cima e para fora, empurrando uma camada fina de muco que retém, levando para o exterior das vias aéreas partículas de poeira, bactérias, fungos e vírus. Essa atividade constante de limpeza do sistema mucociliar é essencial para minimizar a introdução de patógenos no trato respiratório da ave (MCGHEE, 1992).

Assim sendo, o trato respiratório das aves é um dos principais sistemas afetados por doenças infecciosas, resultando grandes prejuízos por toda indústria avícola mundial (JUNIOR; MACARI, 2000).

A Bordetelose é uma doença do trato superior das aves altamente contagiosa causada pela *Bordetella avium* (*B. avium*). Como ocorre em outras espécies patogênicas do gênero *Bordetella* (*B. pertussis* e *B. bronchiseptica*), a *B. Avium* adere preferencialmente às células do epitélio ciliado traqueal, promovendo inflamação e deformação da mucosa respiratória. A subsequente morte das células ciliadas é considerada por contribuir pelos sinais clínicos associados com a Bordetelose (SPEARS et al., 2003).

A Bordetelose é comumente referida como coriza dos perus. Outras sinonímias foram largamente abandonadas como, Rinotraqueíte por Alcaligines (ART), Síndrome da Doença Respiratória Aguda, Rinotraqueíte por *Bordetella avium* (BART), e Rinotraqueíte dos perus. (CALNEK, 1997).

Os membros do gênero *Bordetella* são conhecidos pela sua capacidade de colonizar o epitélio ciliado e produzir doença respiratória nos vertebrados. Apesar da similaridade entre a coqueluche dos humanos, causada pela *B. pertussis*, e a Bordetelose aviária, não há nenhuma evidência de que a *B. avium* possa também colonizar ou causar a doença em humanos (GENTRY-WEEKS et al., 1991).

Em perus, a doença é caracterizada por um início abrupto de espirros, descarga óculo nasal, edema submandibular, dificuldade respiratória, rouquidão, colapso traqueal, perda de peso e predisposição para outras doenças infecciosas (CALNEK, 1997). Em perus jovens, embora a mortalidade seja baixa, a morbidade é alta causando perdas econômicas severas anuais na indústria avícola.

Ao contrário dos perus, o aparecimento de *B. avium* em galinhas e codornas é raro, podendo ocorrer como um agente oportunista (ODUGBO et al., 2006).

A *B. avium* tem sido isolada de espécies domésticas na Alemanha, incluindo patos, gansos, cacatua da crista amarela (*Kakatoe galeria*), papagaios (*Erythurura psittacea*), e perdiz (*Perdix perdix*). Ela também tem sido implicada na síndrome respiratória de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) e avestruzes (*Struthio camelus*) (RAFFEL et al., 2002). Hopkins et al., 1990, reportou que 42 de 44 perus selvagens em Arkansas foram soropositivos para *B. avium*. Em contraste, pouco se sabe sobre a transmissão ou prevalência deste agente em aves silvestres além de perus, ou se a bactéria causa a doença em aves silvestres (RAFFEL et al., 2002).

No Brasil ainda não há relato de casos de *B. avium* em perus, galinhas, codornas e aves silvestres. O presente estudo teve como objetivo a caracterização genotípica e de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *B. avium* provenientes de perus com histórico de aerossaculite.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão serão abordados os principais tópicos sobre a *Bordetella avium* que se encontram descritos na literatura.

2.1 HISTÓRICO

A Bordetelose ou Coriza dos perus foi reportada pela primeira vez por Filion et al. (1967) no Canadá, sendo atribuída a uma bactéria do gênero *Bordetella*. Uma década mais tarde, uma síndrome similar foi reconhecida na Alemanha e nos Estados Unidos, onde o agente causal foi identificado como *Bordetella bronchiseptica-like* e *Alcaligenes faecalis*, respectivamente (HINZ; GLUNDER; LUNDERS, 1978; SIMMONS; ROSE; GRAY, 1979). Então, o nome *Bordetella avium* foi finalmente proposto e aceito em geral (KERSTERS et al., 1984).

2.2 INCIDÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO

A Bordetelose é uma doença muito importante nas maiores regiões produtoras de perus dos Estados Unidos, Canadá, Austrália, e Alemanha. Na Inglaterra, França, Israel e África do Sul, a etiologia da coriza dos perus, inclui frequentemente, viroses e outras bactérias associadas a *B. avium* (CALNEK, 1997). Hopkins et al. (1990), detectou anticorpos de *B. avium* através de ELISA (Enzyme-linked immonosorbent assay) em 42 de 44 perus silvestres que se deslocaram para o Arkansas. Indicando que *B. avium* pode ser um problema significante em perus silvestres ou que estes podem atuar como um reservatório do agente. McBride et al. (1991), pesquisou três plantéis de perus, entre um milhão de fazendas de perus comerciais no interior da Califórnia, e todos os animais examinados nas três propriedades foram soropositivos para *B. avium* através da técnica de microaglutinação.

2.3 ETIOLOGIA

Todas as espécies clássicas do gênero *Bordetella* como *B. pertussis, B. parapertussis, B. bronchiseptica* e *B. avium,* causam infecções do trato respiratório em diferentes hospedeiros. Enquanto *B. pertussis* e uma linhagem de *B. parapertussis* causam infecção apenas em humanos, uma segunda linhagem de *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* causam infecções em ovinos, e em uma variedade de espécies de mamíferos, respectivamente. Estas três espécies com diferentes preferências por hospedeiros são denominadas complexo *B. bronchiseptica*, pois as linhagens conhecidas hoje evoluíram de uma ancestral comum da espécie *B. bronchiseptica* (GROSS; KEIDEL; SCHMITT, 2010).

B. avium tem sido relatada em casos de coriza em perus e infecção respiratória em aves domésticas e silvestres. São raros os relatos desta espécie em humanos, sendo descrito um caso em que houve pneumonia, e outro em paciente com fibrose cística (GROSS; KEIDEL; SCHMITT, 2010). Nos últimos 15 anos novas espécies foram descritas *B. hinzii, B. holmesii, B. trematum, B. ansorpii* e *B. petrii.* Os hospedeiros conhecidos e o tipo de infecção causada por cada uma destas espécies é descrita no quadro 1.

A bordetelose em aves é causada pela *Bordetella avium*, podendo esta agir sozinha ou em combinação com estresse ambiental ou outros patógenos respiratórios. Simmons et al. (1979) nos Estados Unidos, estabeleceu claramente o agente etiológico como um pequeno bacilo Gram-negativo, uma bactéria que foi inicialmente identificada como *Alcaligenes faecalis*, parecida com *Bordetella bronchiseptica*, exceto por não utilizar uréia. Kersters et al. (1984), comparou 28 isolados patogênicos de perus de diversas origens com coleção de cepas relativa a bactéria e, baseado na morfologia, fisiologia, nutrição, estudos sorológicos, eletroforese, e hibridização de DNA-RNA, concluiu que a bactéria causadora da rhinotraqueíte dos perus representava uma nova espécie de *Bordetella*, sendo inicialmente proposto o nome *Bordetella aviam sp. nov*. (HINZ; GLUNDER; LUNDERS, 1978).

Quadro 1 **-** Espécies animais mais afetadas pelo gênero *Bordetella spp*. e quadros clínicos mais freqüentes

Espécies	**Hospedeiros**	**Doença**
Bordetella pertussis	Humanos	Coqueluche
	Chimpanzés	Caso raro de doença, como tosse convulsa em animais de cativeiro
B. parapertussis	Humanos	Forma suave coqueluche
	Ovelhas	Isolados de carneiros saudáveis e com pneumonia
B. bronchiseptica	Suínos	Rinite Atrófica não progressiva e broncopneumonia
	Cães	Traqueobronquite infecciosa canina (Tosse dos canis)
	Coelhos	Roncos, com infecção do trato respiratório superior, broncopneumonia ou septicemia
	Porquinhos-da-índia	Sintomas iguais à doença em coelhos
	Cavalos e gatos	Infecção respiratória
	Humanos	Isolados ocasionalmente de feridas e outros fluídos corporais
B. avium	Perus e outras aves	Coriza, rinotraqueíte e sinusite em perus jovens. Morbidade alta e mortalidade baixa
B. hinzii	Aves (homen)	Infecção respiratória, septicemia em humanos
B. holmezii	Humanos	Septicemia e quadro parecido com a tosse comprida (coqueluche)
B. trematum	Humanos	Otites
B. ansorpii	Humanos	Cisto epidérmico, septicemia
B. petrii	Ambiente e hospedeiros diversos	Doença óssea degenerativa em humanos.

Fonte: adaptado de Quinn et al., 1994, Gross, 2010.

2.3.1 Morfologia e Crescimento

B. avium é um bacilo pleomórfico Gram-negativo, pequeno, medindo 0,2 a 0,5 X 0,5 a 1,0 µ, aeróbio estrito, móvel, devido a flagelos peritríquios, não fermentador de carboidratos, mas sua energia deriva da oxidação de aminoácidos, utiliza o citrato como fonte de carbono orgânico, positivo para catalase e oxidade, porém, não degrada a uréia e não reduz o nitrato. As colonias de *B. avium* crescem em ágar MacConkey, ágar Sangue de carneiro a 5%, ágar Smith-Baskerville (SB) e Brain Heart Infusion (BHI), a 37℃ por 24 – 48 horas (QUI NN, 1994; BIBERSTEIN; HIRSH, 2003).

Em ágar sangue as colônias são pequenas, convexas, lisas e com bordas íntegras após 24 horas de crescimento (QUINN, 1994). Em ágar MacConkey, a maioria das colonias de *B. avium* são pequenas, compactas, translúcidas, com borda íntegra e superfície brilhante. Medem tipicamente 0,2 a 1 mm de diâmetro após 24 horas de incubação e 1 a 2 mm de diâmetro após 48 horas de incubação. Muitas colônias desenvolvem em seu centro uma ligeira saliência de coloração marrom após 48 horas de crescimento em ágar MacConkey. Uma pequena porcentagem de isolados se divide em um tipo de colônia maior, apresentando uma borda irregular e superfície lisa (HINZ; GLUNDER; ROMER, 1983). Já o ágar Smith-Baskerville (SB) contém o azul de bromotimol, um indicador de pH, cuja cor é verde em pH 6,8. Após 24 horas de incubação o meio se torna alcalino e de cor azul, sendo as colônias azuladas e pequenas, medindo 0,5 mm de diâmetro ou menos. Após 48 horas de incubação, as colonias passam a medir 1,0 – 2,0 mm de diâmetro, de coloração azul ou azul com o centro verde, o meio também se torna azul (QUINN, 1994). As colônias possuem superfície coberta de fibrilas. Mas a estrutura da célula é a mesma das demais bactérias Gram-negativas (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003).

2.4 RESISTÊNCIA A AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS

O agente é destruído pela maioria dos desinfetantes, sua sobrevivência é prolongada quando em baixas temperaturas, baixas umidades e pH neutro. Em poeira e fezes, o organismo sobrevive por 25 – 33 dias a 10 ℃ e umidade relativa de 32 -58%, enquanto que, a 40 ℃ com similar umidade, o organismo sobrevive menos que 2 dias (CIMIOTTI; GLUNDER; HINZ, 1982). A fumigação com metil brometo é eficaz em um ambiente contaminado, diminuindo a transmissão do agente entre as aves susceptíveis (SIMMONs; ROSE; GRAY, 1979).

São sensíveis a vários antibióticos de amplo espectro de ação, porém geralmente são resistentes a estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina, penicilina e gentamicina (CUTTER; LUGINBUHL, 1991).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

A maioria dos fatores de virulência da *B. avium* pode ser dividida dentre aqueles que estão envolvidos na adesão, na lesão da mucosa, ou que possuam efeito sistêmico. A adesão ciliar do epitélio respiratório é uma característica consistente da *B. avium* e de outras espécies de *Bordetella*. As estruturas de superfície ou moléculas de *B. avium* responsáveis pela adesão têm sido identificadas, assim como o papel da fímbria (pili) e hemaglutinina (ARP; LEYH; GRIFFITH, 1988).

Vários efeitos locais têm sido atribuídos a toxina de *B. avium*. Um agudo efeito citotóxico e ciliostático de *B. avium* em traquéias de perus foi descrito por Gray et al. (1981). Rimler (1985) descreveu uma toxina termo-lábil capaz de matar camundongos e perus jovens.

Estudos recentes têm demonstrado que a *B. avium* produz uma toxina dermonecrótica com propriedades físicas, antigênicas e biológicas comparadas a aquelas descrita para toxina termo-lábil (GENTRY WEEKS et al., 1988). O papel da

toxina dermonecrótica ainda não tem sido estabelecido na patogenia da Bordetelose em perus; a toxina parece não ser responsável pela ciliostase ou danos epiteliais locais. Outra toxina de *B. avium* que implica na lesão da mucosa local é a citotoxina traqueal (TCT) descrita por Gentry-Weeks et al. (1988). Esta causa especificamente danos nas células do epitélio ciliado, conduzindo a perda deste epitélio e um pobre clearence do muco. Simmons, Dees e Rose (1986), identificou uma toxina termo-estável capaz de causar diarréia e morte em camundongos inoculados experimentalmente, porém, não há evidências de que a toxina produz efeitos adversos em aves.

2.6 VIAS DE TRANSMISSÃO E PERÍODO DE INCUBAÇÃO

A Bordetelose doença altamente contagiosa, é transmitida às aves susceptíveis por contato direto com aves infectadas ou por exposição a alimentos ou água contaminada pelo agente. Lixo contaminado por *B. avium*, pode permanecer contaminado por 1 a 6 meses. O período de incubação varia de 7 a 10 dias (SIMMONS; GRAY, 1978).

2.7 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

A doença geralmente ocorre em aves jovens com 2 a 6 semanas de idade, mas pode ocorrer em aves mais velhas. Os sinais mais característicos são descarga óculo nasal serosa, secreção mucosa traqueal excessiva, espirros, tosse seca, depressão, penas eriçadas e perda de peso, e, em casos severos, sinusite, descarga ocular espumosa, estertor respiratório e colapso traqueal. Infecções secundárias são comuns e podem exacerbar a morbidade e mortalidade em perus jovens (KELLY; GHAZIKHANIAN; MAYEDA, 1985). A doença é caracterizada por uma alta morbidade e baixa mortalidade. Em aves reprodutoras a morbidade chega a 20% e não há mortalidade. Em perus de 2 – 6 semanas de idade, a morbidade

chega em 80 a 100%, enquanto que a mortalidade atinge 10%. Uma alta mortalidade, maior que 40%, em perus jovens está frequêntemente associada com infecção concomitante por *Escherichia coli*. Estudos experimentais de infecções simultâneas por *B. avium* e *E. coli* em perus de 2 – 4 semanas de idade, revelaram uma falha no clearence da traquéia pela *E. coli*, e um aumento da gravidade da aerossaculite a ela atribuída (KELLY; GHAZIKHANIA; MAYEDA, 1985).

As lesões estão limitadas ao trato respiratório superior das aves e variam de acordo com a duração da infecção. As lesões traqueais consistem em um generalizado amolecimento e deformação das cartilagens dos anéis, compressão dorso-ventral, e exudato luminal fibrinomucóide. Esta deformação das cartilagens persiste no mínimo até 53 dias pós-infecção. Em secção transversal dos anéis traqueais, as paredes se encontram espessadas e seu lúmen diminuído. O acúmulo de exudato mucoso na traquéia pode levar a morte por sufocação. Hiperemia da mucosa nasal e traqueal e edema do tecido intersticial da cabeça e pescoço aparecem durante a segunda semana da infecção (ARP; CHEVILLE, 1984).

2.8 PATOGENIA

A adesão inicial pelas bactérias às células ciliadas da mucosa oronasal levam à progressiva colonização da região superior da traqueia e, para os brônquios primários durante a semana seguinte. A expansão da população bacteriana ao longo da mucosa respiratória estimula a inflamação aguda e liberação de muco das células caliciformes levando a espirros, tosse e obstrução nasal. Durante este processo, muitas das células colonizadas por *B. avium* na luz traqueal, deixam grandes superfícies desprovidas de cílios. O mecanismo pelo qual *B. avium* causa danos à mucosa da traquéia e cartilagem não é totalmente claro, mas a citotoxina traqueal pode estar envolvida (CALNEK, 1997).

A formação de cristais de proteínas citoplasmáticas e o atraso na restituição tecidual são sugestivos de uma toxina que altera o crescimento e diferenciação celular. A base molecular para o amolecimento e colapso dos anéis traqueais pode estar relacionada ao metabolismo anormal do tecido conectivo, principalmente

mudanças qualitativas e quantitativas na produção de colágeno e elastina. Como as células ciliadas são progressivamente perdidas, o fluxo de muco e exsudato torna-se lento, particularmente nas porções iniciais da traquéia e cavidade nasal. A obstrução dos ductos nasolacrimais leva a produção de exudato ocular espumoso que se acumula no canto medial do olho (YERSIN, EDENS; SIMMONS, 1990).

Aproximadamente uma semana após o início dos sinais clínicos de Bordetelose, os animais desenvolvem as respostas imunológicas aos antígenos de *B. avium*. Anticorpos transportados pelo soro ou produzidos por células de defesa da submucosa acumulam-se nas secreções respiratórias. Os anticorpos presentes nestas secreções interagem com as células de *B. avium* para inibir a sua mobilidade e evitar a adesão a outras células ciliadas. A população bacteriana se reduz nas próximas semanas, como as células colonizadas são perdidas, as células ciliadas recém-formadas são protegidas por anticorpos contra a colonização pela bactéria. Algumas aves convalescentes demoram mais tempo para eliminar *B. avium* de seus tecidos respiratórios, como a imunidade da mucosa diminui ao longo das próximas 4 a 8 semanas, uma população residual de *B. avium* na cavidade ou seios nasais pode voltar a expandir-se para produzir infecção clínica ou ser transmitida para as aves suscetíveis (CALNEK, 1997).

2.9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Bordetelose é baseado em sinais clínicos e lesões e no isolamento de *B. avium* do trato respiratório. Técnicas adicionais de diagnóstico incluem testes sorologicos (SURESH; ARP, 1993), imunofluorescencia indireta (SURESH, 1993), e a reação em cadeia pela polimerase (SAVELKOUL et al., 1993).

A bordetelose deve ser diferenciada de outras doenças bacterianas e virais, como Micoplasmose, Clamidiose, Doença de Newcastle, Adenoviroses, Influenza vírus e Pneumovirus. Embora, *B. avium* possa produzir sozinha todos os sinais clínicos e lesões da bordetelose, ela frequêntemente é acompanhada pela doença de NewCastle, *Mycoplasmas spp*., e bactérias oportunistas como a *E. coli* (CALNEK, 1997).

2.10 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO AGENTE

A distinção entre as espécies de *Bordetella* tem sido baseada nas características bioquímicas e fisiológicas, em geral perfil de proteínas celulares, determinação da proporção das bases de DNA, e/ou hibridização de DNA – DNA ou DNA – rRNA (SACCO; REGISTER; NORDHOLM, 2000).

A caracterização fenotípica baseada na expressão de características celulares pode variar de acordo com o meio de cultura ou condições experimentais e tem sido gradualmente substituída pela análise genômica do DNA bacteriano. No entanto, estudos abordando a genotipagem desta espécie são escassos (MAGALHÃES et al., 2005; SHIN et al., 2007).

Estudos tem comprovado a vantagem da ferramenta molecular na diferenciação de espécies do gênero *Bordetella*. Métodos como a análise de enzima de restrição (REA) de DNA cromossomal e análise do polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP), Ribotipagem, Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP), Polimorfismo Randômico de DNA Amplificado (RAPD) e Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) tem sido descritos para discriminação entre cepas de *Bordetella* para propósitos epidemiológicos (SACCO; REGISTER; NORDHOLM, 2000).

A eletroforese em campo pulsado (PFGE) é uma técnica reconhecida como padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários. Tem sido utilizada tanto para estudos de surtos de pequenas proporções, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo microrganismos de diferentes países, ampliando o alvo epidemiológico da técnica. O DNA bacteriano total, incorporado em blocos de agarose, é digerido com enzimas de restrição que quebram o cromossomo em grandes fragmentos. Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese de campo pulsado, sendo que os padrões de fragmentos observados em cada cepa são denominados pulsotipo (MAGALHÃES et al., 2005).

Dentre os métodos de análise de DNA desenvolvidos na última década, um dos mais promissores é o AFLP. Um número considerável de estudos descreve a utilização desta técnica no mapeamento genético de plantas e animais, diagnóstico

clínico, estudos filogenéticos e tipagem microbiológica (SAVELKOUL et al., 1999; VOS et al., 1995).

O AFLP tem sido amplamente utilizado em estudos envolvendo a epidemiologia molecular de bactérias Gram negativas e Gram positivas (JANSSEN et al., 1996). Este método envolve a digestão do DNA bacteriano purificado com uma ou duas enzimas de restrição, seguido pela ligação dos fragmentos resultantes a um oligonucleotídeo adaptador de fita dupla, o qual é complementar a sequência de bases do sítio de restrição. Os adaptadores são desenhados de forma que os sítios de restrição originais não sejam restabelecidos após a ligação, o que previne uma nova digestão enzimática. A amplificação seletiva destes fragmentos através da PCR é realizada utilizando-se pares de primers complementares à sequências dos adaptadores. Os fragmentos de DNA amplificado pela PCR são analisados através da eletroforese em gel de agarose (MCLAUCHLIN et al., 2000).

2.11 TRATAMENTO E CONTROLE

O tratamento da Bordetelose pode ser realizado através da administração de antibióticos na água de bebida, ração, por via intra muscular ou por aerossol, produzindo a melhora dos sinais clínicos na maioria dos casos. De acordo com estudos, o tratamento em aves reprodutoras com tetraciclina na água de bebida por três dias produz a melhoria dos sinais clínicos dentro de 24 horas (KELLY; GHAZIKHANIAN; MAYEDA, 1985).

Medidas estritas de biossegurança são necessárias para prevenir a infecção de lotes não contaminados, rigorosos procedimentos de limpeza são necessários para eliminar o organismo a partir de materiais contaminados. Um procedimento de limpeza mínima do local contaminado deve incluir a remoção completa de lixo, lavagem completa de todas as superfícies, desinfecção de sistemas de bebedouros, comedouros e aplicação de desinfetante seguido por fumigação de formaldeído ou pela aplicação em todas as superfícies de uma solução de formaldeído diluído. O agente é facilmente controlado de um lote para outro, de modo que o uso de banhos, pediluvío e roupas limpas são essenciais. Uma vez que a gravidade da bordetelose é exacerbada pela fatores ambientais adversos esforços devem ser feitos para otimizar a temperatura, umidade relativa e qualidade do ar, evitando ou retardando o uso de vacinas vivas atenuadas (CALNEK, 1997).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo:

Caracterizar isolados de *B. avium* provenientes de perus com aerossaculite através da reação em cadeia pela polimerase, perfil de resistência a antimicrobianos, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e o Polimorfismo dos Comprimentos de Fragmentos Amplificados (AFLP).

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 AMOSTRAS

Foram examinados 300 suabes provenientede sacos aéreos de 300 perus com quadro de aerossaculite, abatidos em frigorífico sob Inspeção Federal na região Centro Oeste do País. Destes suabes foram isoladas 20 cepas de *B. avium* que foram empregadas no estudo.

4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO

Os suabes de sacos aéreos foram semeados em ágar Smith-Baskerville (SB), ágar sangue de carneiro e ágar MacConkey e incubados por 24 horas, e se necessário prolongado por mais 24 horas a 37º C em aerobiose. As colônias com coloração e morfologia características de *B. avium* foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para confirmação do gênero espécie.

4.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação do halo de inibição pela prova de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

O inóculo bacteriano utilizado no teste de disco-difusão foi preparado a partir dos cultivos puros de *B. avium* semeado em caldo infusão de cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37 ºC. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução

padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada contém aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Um suabe estéril foi introduzido no interior do tubo contendo a suspensão bacteriana ajustada, pressionado contra a parede do tubo a fim de remover o excesso da suspensão embebida na extremidade do suabe e então, estriado por toda a superfície do ágar Mueller Hinton.

Após a semeadura do inóculo sobre a superfície do ágar, os discos impregnados com princípios antimicrobianos foram distribuídos individualmente. Os princípios utilizados, assim como suas concentrações constam no quadro 2.

Princípio antimicrobiano	**Concentração (µg/mL)**
Ampicilina (AMP)	10
Amoxacilina (AMO)	30
Ceftiofur (CFT)	30
Cotrimoxazol (SUT)	25
Doxiciclina (DOX)	30
Enrofloxacina (ENO)	5
Norfloxacina (NOR)	10
Ciprofloxacina (CIP)	5
Eritromicina (ERI)	15
Lincomicina (LIN)	2
Florfenicol (FLOR)	30
Penicilina** (PEN)	10
Sulfonamidas (SUL)	300
Tetraciclina (TET)	30

** Concentração da penicilina expressa em unidades internacionais por mililitro.

Quadro 2 - Princípios antimicrobianos utilizados na disco-difusão e suas respectivas concentrações

As placas contendo inóculo e discos antimicrobianos foram incubadas em aerobiose a 37ºC por 24 horas e então, examinadas quanto ao aparecimento de halos de inibição ao redor dos discos.

Os diâmetros dos halos de inibição formados no estudo foram interpretados conforme quadro 3. Como ainda não há critérios interpretativos específicos para área veterinária em relação a *B. avium*, foram utilizados valores de outros agentes bacterianos, sendo que para algumas drogas foram usados critérios específicos para uso humano na análise dos resultados obtidos neste estudo.

No teste de disco-difusão foram utilizados como controle de qualidade as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo que as mesmas foram semeadas, respectivamente, em ágar Mueller Hinton (Difco-BBL) e ágar Mueller Hinton suplementado com 5 % de sangue ovino desfibrinado.

Agentes antimicrobianos	Halo de inibição (mm)		
	S[a]	I[b]	R[c]
Ampicilina	≥ 26	19 - 25	≤ 18
Amoxacilina	≥18	14-17	≤13
Ceftiofur	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Cotrimoxazol[d]	≥ 16	11 - 15	≤ 10
Doxiciclina	≥ 16	13 - 15	≤ 12
Enrofloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Norfloxacina	≥ 21	17 - 20	≤ 16
Ciprofloxacina	≥21	16-20	≤15
Eritromicina	≥23	14-22	≤13
Florfenicol	≥ 22	19 - 21	≤ 18
Lincomicina	≥ 21	15 - 20	≤ 14
Penicilina	≥28	20-27	≤19
Sulfonamidas	≥ 17	13 - 16	≤ 12
Tetraciclina	≥ 23	19 - 22	≤ 18

[a] sensível, [b] intermediário, [c] resistente e [d] associação de sulfametoxazol e trimetoprima.

[1] CLSI – M31-A3 (2008)

[2] CLSI – M100-S15 (2005)

Quadro 3 **-** Critérios para interpretação dos halos de inibição do teste de disco-difusão

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA bacteriano foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do isotiocianato de guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucléicos foi descrito por Boom et al. (1990).

Um microtubo contendo 200 µL de um cultivo puro de *B. avium* em infusão cérebro-coração (BHI) recebeu 1000 µl de tampão de lise (120 g isotiocianato de guanidina, 1 mL Triton 100 X, 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 8,8 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL H_2O MilliQ ®), 40 µL de solução carreadora (1 g de Diatomaceous Earth, 50 µL HCl 37 % e 5 mL H_2O MilliQ ®) e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente o microtubo, no qual as células bacterianas já se encontravam lisadas e os DNAs ligados às partículas de sílica, foi centrigado a 12000 x *g* por um minuto e 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o pelete resultante foi submetido a cinco lavagens seguidas. As duas primeira com 500 µL de tampão de lavagem (120 g isotiocianato de guanidina e 10 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] em 100 mL H_2O MilliQ ®), as duas seguintes com 500 µL de etanol 70 % (- 20 ^oC) e a última com 500 µL de acetona. Após as lavagens o microtubo contendo o pelete foi mantido em estufa a 37 ^oC por cerca de 60 minutos. O pelete foi ressuspendido pela adição de 150 µL de tampão de eluição (1 mL Tris-HCl 1 M [pH 6,4] e 0,2 mL EDTA 0,5 M [pH 8] em 100 mL de H_2O MilliQ ®), centrifugado a 12000 x *g* por cinco minutos, removido o sobrenadante (DNA eluído da sílica) e, este, foi armazenado a –20 ºC até sua amplificação.

4.4.1 Amplificação do DNA (PCR)

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 pmoles dos *primers* específicos para *B. avium*, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 200µM de cada dNTP, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A

reação foi submetida a desnaturação a 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 58° C e 1 minuto a 72° C (REGISTER; YERSIN, 2005).

Primers	**Sequência 5'- 3'**	**Amplicon (pb)**	**Referência**
B. avium	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG GCG GCT GCT GGC ACG	520	Register et al, 2005

Quadro 4 **-** Seqüência de *primers* utilizados para identificação de *B. avium*

4.4.2 Detecção do produto de amplificação

Os produtos de amplificação foram segregados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando-se tampão TBE 0,5 X (Tris-base 45 mM, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA pH 8). Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de fotodocumentação ImageMaster ® (Amershan Biosciences) por meio do uso do corante BlueGreen ® (LGC Biotecnologia) e identificados com base na utilização de marcador de pares de base 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.5 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

As amostras foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1X10^{9}, foi incorporada em agarose de baixo ponto de fusão e, após homogeneização, transferida para moldes plásticos. Os *plugs* de agarose resultantes contendo a amostra foram então submetidos a um processo de lise *in situ* e, posteriormente, estocados em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do *plug* foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Xba* I e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1% (BINNS et al., 1998). A eletroforese foi conduzida

em período de 24 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 0,5 segundos e final de 40 segundos, em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA 50 mM Tris, 45 mM Borato, 0,5 mMEDTA [pH 8.4]) mantido a 14°C (STRUELENS; RYCK; DEPLANO, 2001). O gel foi corado por 20 minutos em corante Gel red® (Biotium) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de foto-documentação ImageMaster® (GE Healthcare). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFG Marker (New England Biolabs).

4.6 POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

O protocolo de AFLP realizado seguiu descrição de McLauchin et al. (2000), utiizando a endonuclease de restriçào *Hind III*.

A técnica envolve três etapas básicas:

1- Restrição do DNA bacteriano pela enzima *Hind III;*

Em um microtubo contendo 10 µL do DNA bacteriano extraído foram adicionados 24 U *Hind* III, 2 µL tampão da enzima *Hind* III e 5,6 µL de H_20 MilliQ®, perfazendo urn volume total de 20 µL. Incubou-se esta reação a 37℃ *overnight.* A posição retativa ao sítio de restrição da enzima *Hind* III é apresentada no quadro 5.

2- Ligação de adaptadores de oligonucleotídeos (*primers* ADH 1 e ADH 2) ao DNA digerido;

Em um novo microtubo foram adicionados 5 µL do DNA digerido, 4 µL tarmpão de T4 DNA-ligase, 0,2 µL de cada adaptador (ADH 1 / ADH 2), 1 U T4 DNA ligase e H20 MiliQ® para o volume final de 15 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Ao final deste período o DNA ligado aos adaptadores foi aquecido a 80℃ por 10 minutos. As sequências dos adaptadores ADH 1 e ADH 2 estão descritas no quadro 5.

3- Amplificação seletiva com o *primer* HI-G de conjuntos de fragmentos de restrição;

As amostras foram submetidas a uma amplificação com os *primers* HI-G, descritas no quadro 5.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µL do DNA ligado diluído, 2,5 mM de $MgCl_2$, 300 ng do *primer* (HI-G), 1 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 45 µL. A reação foi submetida à desnaturação a 94 ℃ por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60℃ e 2,5 minutos a 72℃.

1. Fragmento *Hind* III	5´AGCTT----//----A 3´ 3´A----//----TTCGA 5´
2. Adaptadores	ADH 1 5´ ACGGTATGCGACAG 3´ ADH 2 3´ GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5´
3. *Primers*	HI-G 5' GGTATGCGACAGAGCTTG 3'

(1) Sítios de restrição da endonuclease *Hin*d III, (2) Seqüência dos dois oligonucleotídeos complementares que serão os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, (3) Seqüência dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos.

Quadro 5 – Sítio de restrição da enzima *Hind III*, adaptadores e sequências de bases dos adaptadores e dos *primers* HI-G

4.6.1 Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando-se tampão TBE 0,5 X e voltagem de 30 V durante 26 horas. Os fragmentos amplificados foram vizualizados no sistema de fotodocumentação ImageMaster® (Amershan Biosciences), sendo os fragmentos

corados com Blue Green® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DISCRIMINATÓRIO (ID)

Para análise estatística dos fragmentos obtidos através da PFGE e AFLP foi utilizado o programa BioNumerics (Applied Maths). A partir da matriz de similaridade gerada por este coeficiente foi possível determinar os grupos pelo método de UPGMA ("Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average"), os quais foram representados sob a forma de dendrograma.

Para determinação do índice discriminatório os resultados obtidos por meio da PFGE e do AFLP foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988).

As amostras foram consideradas como diferentes pulsotipos na PFGE quando apresentaram mais de quatro bandas de diferença. No caso do AFLP os diferentes perfis foram formados por cepas com mais de 90% de similaridade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 300 suabes de sacos aéreos dos 300 perus examinados em 15 propriedades, apenas isolados de 13 animais (4,33%) foram confirmados como sendo *B. avium* através da PCR (Figura 1). O isolamento de *B. avium* é dificultado pelo crescimento lento no primo isolamento (48h) e pela presença de outros microorganismos em sacos aéreos como *E. coli*, *S aureus* e *Streptococcus spp*., que crescem mais rapidamente, mascarando a definição das colonias de *B. avium* (JACKWOOD; SAIF, 2003).

O número de animais positivos nos diferentes meses de coleta e a origem das amostras são descritos na tabela 1.

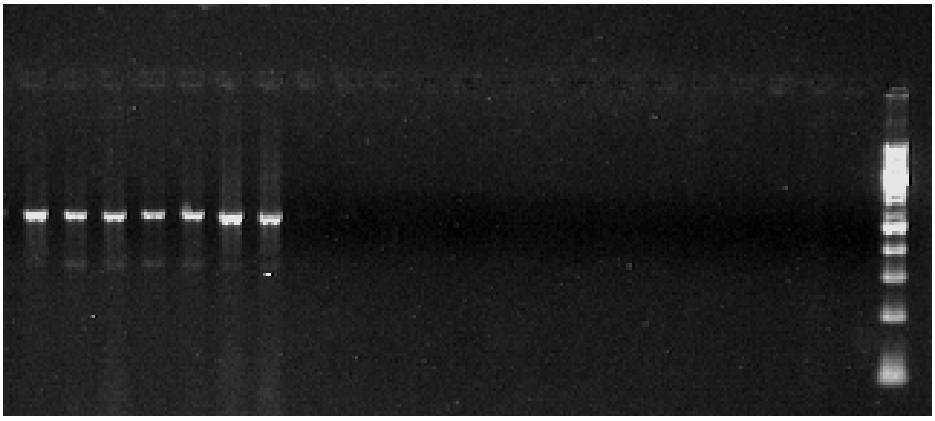


Figura 1Eletroforese em gel de agarose 1,5%- Colunas 1 a 7- amostras positivas para através da PCR, colunas 8 a 22- amostras negativas para *B. avium* através da PCR,Coluna 23- marcador de pares de base 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia)

Tabela 1**-** Resultados dos isolados para *B. avium* obtidos nas coletas dos suabes dos perus realizadas entre maio de 2009 e agosto de 2010

	Mês	**Perus**		
		Examinados	**Positivos**	**Origem**
2009	Maio	85	1	Centro Oeste
	Junho	63	1	Centro Oeste
	Novembro	52	6	Centro Oeste
2010	Março	27	2	Centro Oeste
	Abril	48	2	Centro Oeste
	Maio	25	2	Centro Oeste
	Total	300	13	

Para a avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, realização da PFGE e do AFLP, foram selecionadas 20 cepas de *B. avium* provenientes dos 13 animais positivos.

Através da técnica de disco difusão observou-se uma alta taxa de resistência aos antimicrobianos beta lactâmicos (amoxacilina, ampicilina, penicilina e ceftiofur), assim como para lincomicina, sulfonamidas e combinação sulfonamidas/trimetoprima (cotrimoxazol). Os antimicrobianos com maiores níveis de sensibilidade foram o florfenicol, seguidos pelas quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina), doxiciclina e pelas tetraciclinas (Gráfico 1 e Tabela 2) .

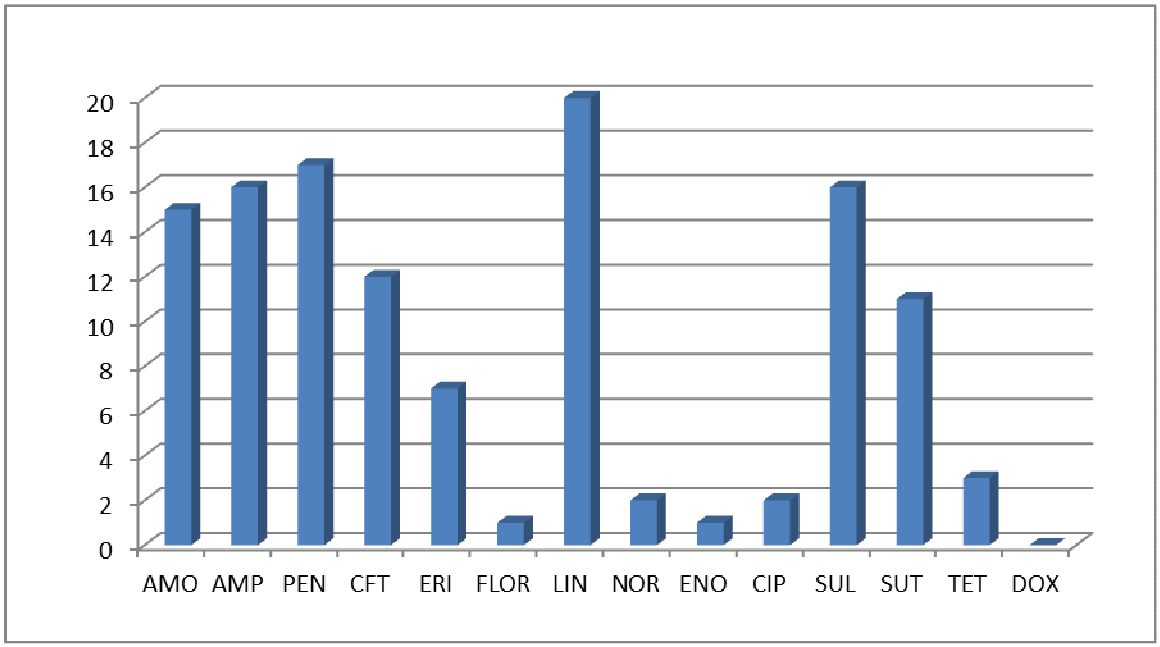


Gráfico 1 - Número de cepas de *B. avium* resistentes aos antimicrobianos testados

De acordo com teste de sensibilidade antimicrobiana feito com 15 isolados de *B. avium*, realizado por Blackall; Eaves e Fegan (1995), todos os isolados foram resistentes a lincomicina, sulfonamidas e combinação sulfonamidas/trimetoprima (cotrimoxazol), o que se aproxima bastante dos resultados obtidos no presente estudo. Ainda segundo Blackall; Eaves e Fegan (1995), a maioria dos isolados foi sensível a tetraciclina, cujo resultado é similar ao desta pesquisa, e todos os isolados foram sensíveis a ampicilina, resultado este, que diverge deste estudo, pois das 20 amostras analisadas, 15 foram resistentes a este antimicrobiano. Isto pode ocorrer devido à presença de diferentes mecanismos de resistência a beta-lactâmicos neste gênero bacteriana (KADLEC et al., 2007). O índice discriminatório do perfil de resistência foi 0,96.

Tabela 2 **-** Perfis de resistência observados dentre as 20 cepas de *B. avium* avaliadas

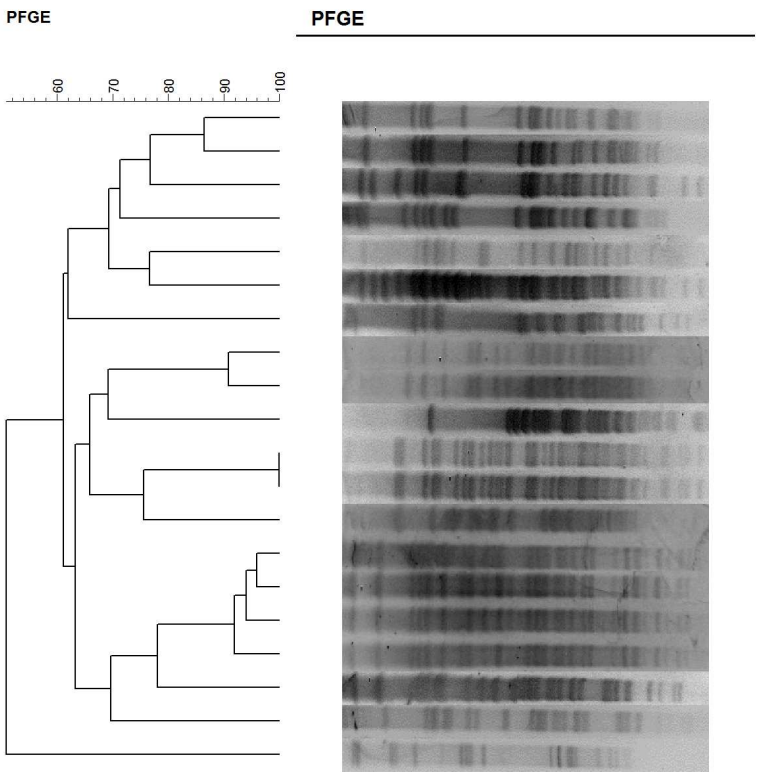
Perfil de resistência	Antimicrobianos	Cepa	Granja	Coleta	Animal
Perfil 1	LIN	341	Granja G	Coleta 15	Animal 1
Perfil 1	LIN	345	Granja G	Coleta 8	Animal 1
Perfil 2	LIN, SUL, SUT	344	Granja G	Coleta 8	Animal 4
Perfil 3	AMP, PEN, LIN	170	Granja K	Coleta 12	Animal 2
Perfil 4	AMP, PEN, LIN, SUL, SUT	171	Granja K	Coleta 12	Animal 2
Perfil 5	AMO, PEN, ERI, LIN, NOR, ENO, SUL	157	Granja J	Coleta 11	Animal 10
Perfil 6	AMO, AMP, PEN, LIN, SUL, SUT	153	Granja J	Coleta 11	Animal 3
Perfil 7	AMO, AMP, PEN, ERI, LIN, CIP, SUL, TET	158	Granja J	Coleta 11	Animal 10
Perfil 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT	119	Granja H	Coleta 9	Animal 14
Perfil 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT	343	Granja G	Coleta 8	Animal 4
Perfil 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT	351	Granja M	Coleta 14	Animal 4
Perfil 9	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL	79	Granja G	Coleta 8	Animal 30
Perfil 9	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL	342	Granja N	Coleta 8	Animal 4
Perfil 10	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, CIP	52	Granja E	Coleta 5	Animal 5
Perfil 11	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN,	25	Granja C	Coleta 3	Animal 1
Perfil 12	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, SUL, SUT, TET	118	Granja H	Coleta 9	Animal 14
Perfil 12	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, SUL, SUT, TET	353	Granja M	Coleta 14	Animal 4
Perfil 13	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, NOR, SUL, SUT	346	Granja G	Coleta 8	Animal 16
Perfil 14	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, CIP, SUL, SUT	350	Granja M	Coleta 14	Animal 4
Perfil 15	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, FLOR, LIN, CIP, SUL, SUT	106	Granja G	Coleta 8	Animal 30

Na PFGE, o número de fragmentos de DNA gerados por perfil, variou entre 15 e 26, enquanto que seus tamanhos variaram entre 30 a 450 Kb. A partir dos 20 isolados de *B. avium*, foram observados 14 perfis eletroforéticos, denominados pulsotipos 1 a 14, os quais foram diferentes entre si pela ausência ou presença de quatro bandas ou mais. O índice discriminatório obtido pela PFGE foi de 0,95.

Através da análise do dendrograma (Figura 2), podem ser observados dois grupos principais denominados I (pulsotipos 1 a 6) e II (pulsotipos 7 a 13). Em ambos os grupos foram reunidas amostras de diferentes origens, ou seja, de granjas distintas, das quais as coletas foram realizadas em diferentes datas. No grupo I, todas as cepas foram isoladas de diferentes animais, enquanto que no grupo II, foram reunidas cepas que eram dos mesmos animais no mesmo perfil, podendo ser consideradas amostras clonais. Houve uma grande diversidade de cepas na coleta 8, formando seis perfis distintos através da PFGE e sete perfis de resistência a antimicrobianos.

Os pulsotipos 7 (animal 2, coleta 12), 9 (Animal 10, coleta 11) e 11 (3 cepas do animal 4, coleta 14), foram os perfis mais homogêneos em relação a PFGE, porém todos com diferentes perfis de resistência a antimicrobianos. Nos pulsotipos 5 e 13, observa-se a situação oposta, duas cepas do animal 14, coleta 9, apresentaram pulsotipos bastante distintos (< 60% de similaridade) e com perfis de resistência diferentes, indicando que o mesmo animal pode ser portador de diferentes estirpes do agente. Em todos os outros perfis foram agrupados animais de origem distinta com variados perfis de resistência.

Ainda não há descrição na literatura da técnica de PFGE para tipagem de *Bordetella avium*. A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) é utilizada tanto para estudos de surtos de pequenas proporções, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo microrganismos de diferentes países, ampliando o alvo epidemiológico da técnica. A variação do padrão de bandas geradas pela técnica é o reflexo direto da relação genética entre amostras bacterianas examinadas. Uma linhagem é considerada semelhante à outra quando ocorre um único evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão de bandas. Considera-se que um mínimo de 10 fragmentos de DNA, consequêntemente 10 bandas no gel, devem ser obtidos por bactérias para que a técnica tenha poder discriminatório relevante (MAGALHÃES et al., 2005). Neste estudo, a quantidade de fragmentos de DNA gerados por perfil, variou entre 15 a 26, o que indica a representatividade em todos os perfis gerados pela PFGE.



106	Pulsotype 1	Herd G	Collect 8	Animal 30	Resistotype 15	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, FLOR, LIN, CIP, SUL, SUT
346	Pulsotype 1	Herd G	Collect 8	Animal 16	Resistotype 13	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, NOR, SUL, SUT
342	Pulsotype 2	Herd N	Collect 8	Animal 4	Resistotype 9	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL
153	Pulsotype 3	Herd J	Collect 11	Animal 3	Resistotype 6	AMO, AMP, PEN, LIN, SUL, SUT
119	Pulsotype 5	Herd H	Collect 9	Animal 14	Resistotype 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT
343	Pulsotype 4	Herd G	Collect 8	Animal 4	Resistotype 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT
25	Pulsotype 6	Herd C	Collect 3	Animal 1	Resistotype 11	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN,
170	Pulsotype 7	Herd K	Collect 12	Animal 2	Resistotype 3	AMP, PEN, LIN
171	Pulsotype 7	Herd K	Collect 12	Animal 2	Resistotype 4	AMP, PEN, LIN, SUL, SUT
341	Pulsotype 8	Herd G	Collect 15	Animal 1	Resistotype 1	LIN
157	Pulsotype 9	Herd J	Collect 11	Animal 10	Resistotype 5	AMO, PEN, ERI, LIN, NOR, ENO, SUL
158	Pulsotype 9	Herd J	Collect 11	Animal 10	Resistotype 7	AMO, AMP, PEN, ERI, LIN, CIP, SUL, TET
345	Pulsotype 10	Herd G	Collect 8	Animal 1	Resistotype 1	LIN
344	Pulsotype 11	Herd G	Collect 8	Animal 4	Resistotype 2	LIN, SUL, SUT
353	Pulsotype 11	Herd M	Collect 14	Animal 4	Resistotype 12	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, SUL, SUT, TET
351	Pulsotype 11	Herd M	Collect 14	Animal 4	Resistotype 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT
350	Pulsotype 11	Herd M	Collect 14	Animal 4	Resistotype 14	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, CIP, SUL, SUT
79	Pulsotype 12	Herd G	Collect 8	Animal 30	Resistotype 9	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL
118	Pulsotype 13	Herd H	Collect 9	Animal 14	Resistotype 12	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, SUL, SUT, TET
52	Pulsotype 14	Herd E	Collect 5	Animal 5	Resistotype 10	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, CIP

Pulsotype = pulsotipo, Herd = granja, Collect = coleta, Resistotype= perfil de resistência.

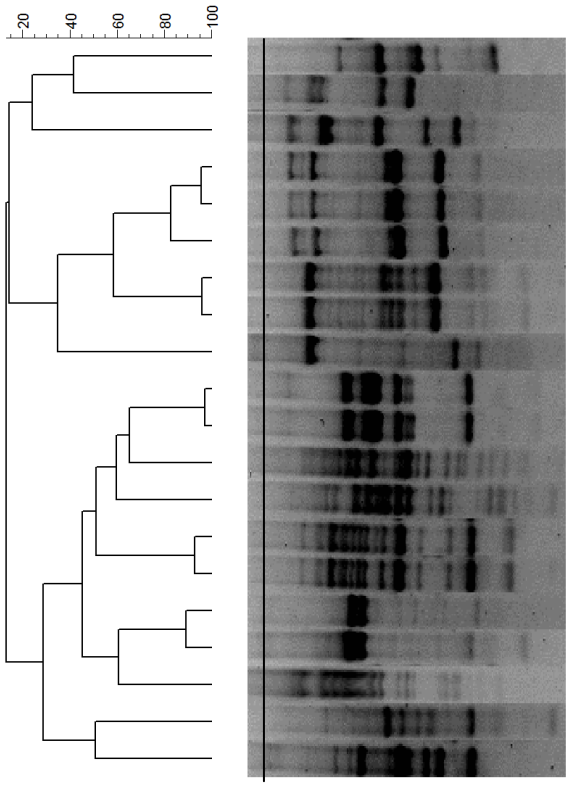
Figura 2 - Dendrograma criado para análise dos resultados da PFGE baseado no coeficiente de Dice e UPGMA. Cepas de *Bordetella avium* isoladas de perus com aerossaculite

No AFLP, o número de fragmentos de DNA gerados por perfil, variou entre 9 e 19, enquanto que seus tamanhos variaram entre 400 a 1300 pb. A partir dos 20 isolados de *B. avium*, foram observados 15 perfis eletroforéticos, denominados de 1 a 15, representados por cepas com similaridade inferior a 90% na análise pelo coeficiente de Pearson (Figura 3). O índice discriminatório obtido pelo AFLP foi de 0,97.

Através da análise do dendrograma, podem ser observados dois grupos principais denominados I (perfil 1 a 7) e II (perfil 8 a 15), com coeficiente de similaridade menor que 20%. Em ambos os grupos foram reunidas amostras de diferentes origens, ou seja, de granjas distintas, das quais as coletas foram realizadas em diferentes datas.

Os perfis 4 (animal 4, coleta 14, pulsotipo 11), 6 (animal 30, coleta 8, pulsotipos 1 e 12) e 8 (animal 10, coleta 11, pulsotipo 9), 11 (animal 2, coleta 12 e pulsotipo 7) foram os mais homogêneos, apresentando cepas clonais porém todas com diferentes perfis de resistência. Assim como na PFGE, foram observadas cepas do mesmo animal agrupadas em perfis diferentes, com perfil de resistência a antimicrobianos distintos.

A coleta 8 foi a que deu origem ao maior número de isolados, um total de sete cepas provenientes de quatro animais do mesmo produtor. Este grupo de sete cepas foi muito heterogêneo através da PFGE, do AFLP e do perfil de resistência, formando seis pulsotipos distintos através da PFGE, seis perfis no AFLP, e cinco perfis de resistência a antimicrobianos.



25	Pulsotype 6	Herd C	Collect 3	Animal 1	Resistotype 11	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN,
343	Pulsotype 4	Herd G	Collect 8	Animal 4	Resistotype 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT
118	Pulsotype 13	Herd H	Collect 9	Animal 14	Resistotype 12	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, SUL, SUT, TET
350	Pulsotype 11	Herd M	Collect 14	Animal 4	Resistotype 14	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, CIP, SUL, SUT
351	Pulsotype 11	Herd M	Collect 14	Animal 4	Resistotype 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT
353	Pulsotype 11	Herd M	Collect 14	Animal 4	Resistotype 12	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, SUL, SUT, TET
106	Pulsotype 1	Herd G	Collect 8	Animal 30	Resistotype 15	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, FLOR, LIN, CIP, SUL, SUT
79	Pulsotype 12	Herd G	Collect 8	Animal 30	Resistotype 9	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL
342	Pulsotype 2	Herd N	Collect 8	Animal 4	Resistotype 9	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL
157	Pulsotype 9	Herd J	Collect 11	Animal 10	Resistotype 5	AMO, PEN, ERI, LIN, NOR, ENO, SUL
158	Pulsotype 9	Herd J	Collect 11	Animal 10	Resistotype 7	AMO, AMP, PEN, ERI, LIN, CIP, SUL, TET
153	Pulsotype 3	Herd J	Collect 11	Animal 3	Resistotype 6	AMO, AMP, PEN, LIN, SUL, SUT
345	Pulsotype 10	Herd G	Collect 8	Animal 1	Resistotype 1	LIN
170	Pulsotype 7	Herd K	Collect 12	Animal 2	Resistotype 3	AMP, PEN, LIN
171	Pulsotype 7	Herd K	Collect 12	Animal 2	Resistotype 4	AMP, PEN, LIN, SUL, SUT
346	Pulsotype 1	Herd G	Collect 8	Animal 16	Resistotype 13	AMO, AMP, PEN, CFT, ERI, LIN, NOR, SUL, SUT
52	Pulsotype 14	Herd E	Collect 5	Animal 5	Resistotype 10	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, CIP
344	Pulsotype 11	Herd G	Collect 8	Animal 4	Resistotype 2	LIN, SUL, SUT
119	Pulsotype 5	Herd H	Collect 9	Animal 14	Resistotype 8	AMO, AMP, PEN, CFT, LIN, SUL, SUT
341	Pulsotype 8	Herd G	Collect 15	Animal 1	Resistotype 1	LIN

Pulsotype = pulsotipo, Herd = granja, Collect = coleta, Resistotype= perfil de resistência.

Figura 3 - Dendrograma criado para análise dos resultados do AFLP baseado no coeficiente de Pearson e UPGMA. Cepas de *Bordetella avium* isoladas de perus com aerossaculite.

Assim como na PFGE, ainda não há descrição na literatura da técnica de AFLP para tipagem de *Bordetella avium*. A quantidade de fragmentos gerados pelo AFLP necessária para assegurar significante representatividade de um perfil de indivíduo permanece ainda desconhecida. Este fato poderia conduzir a conclusões incorretas a respeito da identidade real de indivíduos dentro de um estudo, uma vez que um número insuficiente de fragmentos pode encobrir a existência de diferenças genéticas (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

A quantidade de fragmentos de DNA gerados por perfil, variou entre 9 e 19. Possivelmente, as amostras que apresentaram números reduzidos de fragmentos, foram pouco ou não representativas de determinado perfil. No entanto, a média do número de fragmentos exibidos na eletroforese foi de 14, o que certamente garantiu a representatividade da maioria dos perfis gerados pelo AFLP.

Os resultados obtidos sugerem que a técnica do AFLP foi um pouco mais discriminatória que a PFGE (ID 0,95), chegando a um índice de 0,97. Esta técnica tem sido amplamente aceita como uma ferramenta de genotipagem devido ao poder discriminatório e boa reprodutibilidade, e facilidade de execução (VAN BELKUM et al., 2001). Geralmente os métodos fenotípicos que envolvem sorotipagem ou perfis de resistência a antimicrobianos apresentam menor capacidade de discriminação de cepas que os métodos genotípicos atuais. No presente estudo, o perfil de resistência apresentou índice discriminatório de 0,96, colocando-se no mesmo patamar que o AFLP e a PFGE. Este achado pode estar relacionado ao pequeno número de amostras testadas, sendo necessários estudos com populações maiores a fim de validar esta informação e verificar se os perfis de resistência seriam ferramentas adequadas no caso de caracterização de surtos de bordetelose.

De modo geral, as cepas isoladas não apresentam comportamento sugestivo de um surto de origem comum por nenhuma das técnicas utilizadas (antibiograma, PFGE ou AFLP), mas sim de um agente que circula de forma endêmica e há bastante tempo nestas populações.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- Apesar da baixa freqüência de isolamento de *B. avium* em amostras oriundas de perus, sabe-se que este agente apresenta importante papel nas infecções do trato respiratório superior desta espécie.

- As cepas da espécie *B. avium* apresentaram uma alta taxa de resistência aos antimicrobianos beta lactâmicos como descrito para outras espécies do gênero.

- A grande diversidade dos perfis de resistência obtidos reafirma a importância da escolha certa das drogas nos tratamentos das infecções por este agente.

- Todas as cepas puderam ser avaliadas através da PFGE do AFLP, sendo esta a primeira descrição do uso destas técnicas para esta espécie bacteriana.

- Tanto a PFGE como o AFLP apresentou alto poder discriminatório e resultados semelhantes, sendo boas opções para a caracterização genotípica de *Bordetella avium*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ARP, L. H.; CHEVILLE, N. F. Tracheal lesions in young turkeys infected with Bordetella avium. **American Journal Veterinary Research**, v. 45, p. 2196–2200, 1984.

ARP, L. H.; LEYH, R. D.; GRIFFITH, R. W. Adherence of *Bordetella avium* to tracheal mucosa of turkeys: Correlation with hemagglutination. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, p. 69 –696, 1988.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. *Bordetella*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 27, p.140-142.

BINNS, S. H.; SPEAKMAN, A. J.; DAWSON, S.; BENNETT, M, GASKELL, R. M.; HART, C. A. The use of pulsed-Field gel electrophoresis to examine the epidemiology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from cats and other species. **Epidemiology Infectious**, v. 120, p. 201-208, 1998.

BLACKALL, P. J.; EAVES, L. E.; FEGAN, M. Antimicrobial sensitivity testing of Australian isolates of Bordetella avium and Bordetella avium-like organism. **Australian Veterinariy Journal**, v. 72, n. 3, p. 97–100, 1995.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.459-453. 1990.

CALNEK, B. W. Bordetellosis (Turkey Coriza). In: _____ **Diseases of Poultry**, 10ª. ed. Ames (IA): Iowa State University Press., 1997. p. 275–287.

CIMIOTTI, W.; GLUNDER, G.; HINZ, K. H. Survival of the bacterial turkey coryza agente. **Veterinary Record**, v. 110, p. 304–306, 1982.

CUTTER, D. L.; LUGINBUHL, G. H. Characterization of sulfonamide resistance determinants and relatedness of *Bordetella avium* R plasmidis. **Plasmid**, v. 26, p. 136 -140, 1991.

FILION, P. R.; CLOUTIER, S.; VRANCKEN, E. R.; BERNIER, G. Infection Respiratoire du dindoneeau cause par un microbe apparente au *Bordetella*

Bronchiseptica. **Canadian Journal Comp. Medicine Veterinary Science**, v. 31. p. 129–134, 1967.

GENTRY-WEEKS, C. R.; COOKSON, B. T.; GOLDMAN, W. E.; RIMLER, R. B.; PORTER, S. B.; CURTISS III, R. Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium*. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 1698-1707, 1988.

GENTRY-WEEKS, C. R.; PROVENCE, D. L.; KEITH, J. M.; CURTIS, R. Isolation and Characterization of *Bordetella avium* Phase Variants. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4026–4033, 1991.

GRAY, J. G.; ROBERTS, J. F.; DILMAN, R. C.; SIMONS, D. G. Cytotoxic activity of pathogenic Alcaligenes faecalis in turkey tracheal organ cultures. **Americam Journal Veterinary Research**, v. 42, p. 2184 – 2186, 1981.

GROSS, R.; KEIDEL, K.; SCHMITT, K. Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella.* **Medical Microbiology and Immunology**, v.199, n. 3, p. 155-163, 2010.

HINZ, K. H.; GLUNDER, G.; ROMER, K. J. A comparative study of avian *Bordetella-like* strains, *Bordetella bronchiseptica*, *Alcaligenes faecalis* and other related nonfermentable bacteria. **Avian Pathology**, v. 12, p. 263-276, 1983.

HINZ, K. H.; GLUNDER, G.; LUNDERS, H. Acute Respiratory Disease in Turkey Poults Causaded by Bordetella bronchiseptica-like bacteria**. Veterinary Record**, v. 103, p. 262–263, 1978.

HOPKINS, B. A.; SKEELES, J. K.; HOUGHTEN, G. E.; SLAGLE, D.; GARDNER, K. A Survey of Infectious Diseases in Wild Turkeys (Meleagidis gallopavo silvestris) from Arkansas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, p. 468–472, 1990.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

JACKWOOD, M. V.; SAIF, Y. M. Bordetellosis (turkey coriza). In: SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**, 11ª. ed. Ames (IA): Iowa State University Press. 2003. p. 705–718.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZEBEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Micribiology**, v. 142, p. 1881–1893, 1996.

JUNIOR, A. B.; MACARI, M. Enfermidade do Sistema respiratório. In: _____ **Doença das Aves**, 1ª. ed. São Paulo: Facta, 2000, p. 71–74.

KADLEC, K.; WIEGAND, I.; KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S. Studies on the mechanism of β- Lactam resistence in *Bordetella bronchiseptica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p. 396 - 402, 2007.

KELLY, B. J.; GHAZIKHANIAN, G. Y.; MAYEDA, B. Clinical Outbreak of Bordetella avium Infection in Two Turkey Breeder Flocks. **Avian Disease**, v. 30, p. 234–237, 1985.

KERSTERS, K.; HINZ, K. H.; HERTLE, A.; SEGERS, P.; LIEVENS, A.; SIEGMANN, O.; DE LEY, J. *Bordetella avium sp*. nov.isolated from the respiratory tracts of turkey and other birds. **International. Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 34, p. 56–70, 1984.

MACARI, M. **Fisiologia Aviária aplicada a Frangos de corte**. São Paulo:Funep. 1994. p. 31–34,

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MCBRIDE, M. D.; HIRD, D. W.; CARPENTER, T. E.; SNIPES, K. P.; DANAYE-ELMI, C.; UTTERBACK, W. W. Health survey of backyard poultry and other avian species located within one mile of commercial California meat-turkey flocks. **Avian Disease**, v. 35, p. 403–407, 1991.

MCGHEE, J. The Mucosal Immune System from Fundamental Concepts to Vaccine Development. **Vaccine**, v. 10, p. 75–88, 1992.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 10, p. 389–394, 1999.

ODUGBO, M. O.; MUSA, U.; EKUNDAYO, S. O.; OKEWOLE, P. A.; ESINOLU, J. *Bordetella avium* Infection in Chickens and Quail in Nigeria: Preliminary investigations. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 1–5, 2006.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**, London: WOLFE, 1994. 684 p.

RAFFEL, T. R.; REGISTER, K. B.; KAREN. B.; MARKS, S. A.; TEMPLE, L. Prevalence of *Bordetella avium* infection in selected wild and domesticated birds in the Eastern USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, p. 40–46, 2002.

REGISTER, K. B.; YERSIN, A. G. Analytical Verification of a PCR Assay for identification of *Bordetella avium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5567–5573, 2005.

RIMLER, R. B. Turkey coryza: toxin production by *Bordetella avium*. **Avian Disease**, v. 29, p. 1043–1047, 1985.

SACCO, R. E.; REGISTER, K. B.; NORDHOLM, G. E. Restriction enzyme analysis and ribotyping distinguish *Bordetella avium* and *Bordetella hinzii* isolates. **Epidemiology Infectious**, v. 124, p. 83–90, 2000.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L.; SCHOULS, L.; LENTRA, J. A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3083–3091, 1999.

SAVELKOUL, P. H. M.; GROOT, L. E. G. M.; BOERSMA, C.; LIVEY, I.; DUGGLEBY, C. J.; VAN DER ZEIJST, B. A. M.; GAASTRA, W. Identification of *Bordetella avium* using the polymerase chain reaction. **Microbial Pathogenesis**, v 15, p. 207 – 215, 1993.

SHIN, E.K.; SEO, Y.S; HAN, J.H.; HAHN, T.W. Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. **Journal of Veterinary Science**, v. n. 1, 65–73, 2007.

SIMMONS, D. G.; GRAY, J. G. Transmission of Acute Respiratory Disease (Rhinotracheitis) of Turkeys. **Avian Disease**, v. 23, p. 132–138, 1978.

SIMMONS, D. G.; GRAY, J. G.; ROSE, L. P.; DILLMAN, R. C.; MILLER, S. E. Isolation of an etiologic agent of acute respiratory disease (rhinotracheitis) of turkey poults. **Avian Disease**, v. 23, p. 194–203, 1979.

SIMMONS, D. G.; ROSE, L. P.; GRAY, J. G. Some Physical, Biochemic, and Pathologic Properties of Alcaligenes faecalis, the Bacterium Causing Rhinotracheitis (Coryza) in Turkey Poults. **Aviam Disease**, v. 24, p. 82–90, 1979.

SIMMONS, D. G.; DEES, C.; ROSE, L. P. A heat-stable toxin isolated from turkey coryza agent, *Bordetella avium*. **Avian Disease**, v. 30, p. 761–765, 1986.

SPEARS, P. A.; TEMPLE, L. M.; MIYAMAMOTO, D. M.; MASKELL, D. J.; ORNDORFF, P. E. Unexpected Similarities between *Bordetella avium* and Other Pathogenic Bordetellae. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2591–2597, 2003.

STRUELENS, M. J.; RYCK, R.; DEPLANO, A. Analysis of microbial genomic macrorestrition patterns by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing. In: DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRUELENS, M. J. (Ed.). **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**, London: Elsevier, 2001. p. 159–176.

SURESH, P. Detecting *Bordetella avium* in tracheal sections of turkeys by monoclonal antibody-based indirect fluorescence microscopy. **Avian Pathology**, v. 22, p. 791–795, 1993.

SURESH, P.; ARP, L. H. A monoclonal antibody-based latex bead agglutination test for the detection of *Bordetella avium*. **Avian Disease**, v. 37, p. 767 – 772, 1993.

VAN BELKUM, A.; STRUELENS, M.; VISSER, A. de; VERBRUG, H.; TIBAYRENC, M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p. 547–560, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HOMES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

YERSIN, A. G.; EDENS, F. W.; SIMMONS, D. G. Tryptophan 2, 3-dioxygenase activity in turkey poults infected with *Bordetella avium*. **Comparative. Biochemistry. Physiology**, v. 97B, p. 755–760, 1990.