



PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIA ANIMAL

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Pesquisa de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas do estado de Pernambuco, Brasil.

RECIFE-PE

2020

ÓRION PEDRO DA SILVA

Pesquisa de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas do estado de Pernambuco, Brasil.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito obrigatório para obtenção de título de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia na Linha de Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientadora: Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

RECIFE-PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

111p Da Silva, Órion Pedro

Pesquisa de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas do estado de Pernambuco, Brasil.: Estudo de ocorrência / Órion Pedro Da Silva. - 2020.

35 f. : il.

Orientadora: Profa Dra Mércia Rodrigues Barros. Coorientador: Prof Dr Marcelo Mendonça.

Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

1. *Gallibacterium anatis*. 2. avicultura. 3. patógeno emergente. 4. zoonose. I. Barros, Profa Dra Mercia Rodrigues, orient. II. Mendonca, Prof Dr Marcelo, coorient. III. Título

CDD 636.089

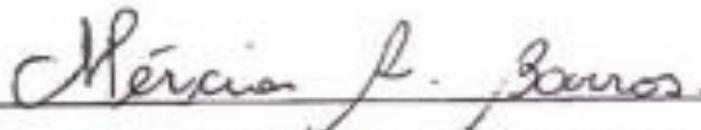
ÓRION PEDRO DA SILVA

Pesquisa de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas do estado de Pernambuco, Brasil.

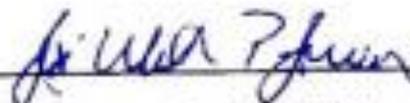
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito obrigatório para obtenção de título de Mestre em Biociência Animal.

Aprovado em 19/02/2020

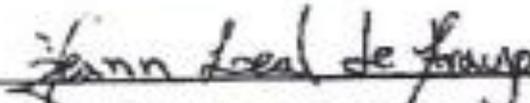
BANCA EXAMINADORA



Professora Dra. Mércia Rodrigues Barros
Área de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária –
UFRPE Presidente



Professor Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Área de Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária –
UFRPE Titular



Professor Dr. Jeann Leal de Araújo
Laboratório de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária –
UFPB Titular

DEDICATÓRIA

À Deus e toda minha família em especial minha esposa Michelle e minha filha querida Ana Sofia meu maior presente.

A minha orientadora Mércia Rodrigues Barros pelas broncas necessárias e orientação sempre que solicitada, a quem admiro demais.

Aos meus amigos e irmãos que me deram forças nessa jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho viesse a ter êxito

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força, saúde e coragem para continuar sempre mesmo nos momentos dedíficeis.

À minha base que é minha família e amigos.

À minha orientadora Professora Mércia Rodrigues Barros, por toda paciência, persistência e exemplo. Ao Professor Marcelo Mendonça por toda orientação e paciência quando necessário e pelas aulas de PCR.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Infecciosas por todo apoio em especial a Renata Pimentel (Renatinha) um anjo em forma de pessoa... e ao Professor Rinaldo Aparecido Mota, por permitir e viabilizar para que as análises moleculares (PCR) fossem realizadas.

Aos amigos do grupo de Ornitopatologia da UFRPE: Marcus, Saruanna, Felipe, Hellen, Roberta, Raissa, Priscila, Lucas, Clarício, Willyanne e os demais.

Agradeço imensamente a Doutora Cláudia Henss e ao seu grupo de pesquisa na Austria pela gentil concessão da cepa bacteriana de *Gallibacterium anatis*, a qual foi fundamental para padronizar e realizar a técnica de PCR na pesquisa.

Deus é nosso refúgio e fortaleza, socorro sempre presente nas tribulações.

(Salmos 46:1)

“Os covardes nunca tentam, os fracos desistem e ficam pelo caminho, mas só os fortes (persistentes) alcançam a vitória”.

(Adaptado de Norman Vincent)

RESUMO

A avicultura está entre as atividades agropecuárias de maior importância para a economia brasileira, assim como para o estado de Pernambuco. Por isso, o controle de doenças que possam interferir na produção é essencial, e inúmeras doenças emergentes têm surgido, causadas por diversos patógenos, dentre os quais está o *Gallibacterium anatis*, que foi descrito inicialmente como agente comensal do trato respiratório, digestivo e reprodutivo das aves, porém existem inúmeros relatos relacionando a este patógeno com prejuízos econômicos na produção comercial. Diante do exposto, objetivou-se pesquisar *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais em granjas avícolas no estado de Pernambuco, Brasil. Foram selecionados por conveniência 20 lotes de diferentes granjas avícolas, das quais 10 eram de frangos de corte e 10 de poedeiras comerciais, em cada lote, de forma aleatória, foram coletados 10 swabs, cinco traqueais e cinco cloacais, de aves selecionadas aleatoriamente, totalizando 200 amostras. As amostras de swabs coletadas foram conservadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), e encaminhadas ao laboratório para cultivo e isolamento microbiológico, coloração de Gram, catalase e provas bioquímicas. Foram isoladas 366 colônias bacterianas, das quais 227 foram selecionadas através de características morfotintoriais e provas bioquímicas. E posteriormente foi realizada a extração do material genético por meio do Kit comercial Promega®, direto dos caldos com swabs. E das colônias isoladas, foi realizada por meio da extração térmica, e posteriormente submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos detectaram *G. anatis* em 41 amostras de swabs sendo 29 de traqueia e 12 de cloaca, e em 33 das colônias selecionadas, foram confirmadas. A bactéria *G. anatis* esteve presente em (75%) dos lotes pesquisados, por isso sugerimos que é necessário um monitoramento com relação a este agente na produção avícola, o qual apresenta um potencial patológico relatado em diversas pesquisas, as quais sugerem que o mesmo é uma potencial ameaça na produção avícola, por causar queda na produção de ovos e/ou baixa conversão alimentar secundária a lesões no sistema digestório, como consequências podem levar à perdas econômicas ao produtor. Além disso este agente também possui potencial zoonótico, isto torna-o relevante para a saúde pública.

Palavras chave: *Gallibacterium anatis*, avicultura, patógeno emergente, zoonose.

ABSTRACT

Poultry farming is among the activities agricultural activities of greater importance to the Brazilian economy, as well as for the state of Pernambuco. Therefore, disease control that may interfere with production is essential, and numerous emerging diseases have emerged, caused by several pathogens, among which is *Gallibacterium anatis*, which was initially described as a commensal agent in the respiratory, digestive and reproductive tract of birds, however, there are countless reports relating to this pathogen with economic losses in commercial production. Given the above, the objective was to research *Gallibacterium anatis* in broilers and laying hens in poultry farms in the state of Pernambuco, Brazil. For convenience, 20 lots of different poultry farms were selected, of which 10 were broilers and 10 commercial laying hens, in each batch, at random, 10 swabs, five tracheal and five cloacals, were collected from randomly selected birds, totaling 200 samples. The swab samples collected were kept in Brain Heart Infusion (BHI) broth, and sent to the laboratory for cultivation and microbiological isolation, Gram stain, catalase and biochemical tests. They were isolated 366 bacterial colonies, of which 227 were selected through morphotintorial characteristics and biochemical tests. And after genetic material was extracted through the Promega® Commercial Kit, end the isolated colonies, was performed through thermal extraction, and subsequently subjected to polymerase chain reaction (PCR). The results obtained detected *G. anatis* in 41 swab samples, 29 of which were tracheal and 12 of cloaca, and in 33 of the selected colonies, they were confirmed. The bacterium *G. anatis* was present in (75%) of the surveyed lots, which has a pathological potential reported in several surveys, which suggest that it is a potential threat in poultry production, for causing a drop in egg production and / or low feed conversion secondary to lesions in the digestive system, as a consequence it can lead to economic losses for the producer. In addition, this agent also has zoonotic potential, which makes it relevant to public health.

Keywords: *Gallibacterium anatis*, poultry farming, emerging pathogen, zoonosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Patógenos emergentes	15
2.2. Epidemiologia.....	16
2.3. Transmissão	17
2.5. Diagnóstico.....	19
2.5. Tratamento e Controle	20
3. OBJETIVOS	21
Geral.....	21
Específicos	21
4. REFERÊNCIAS	22
5. ARTIGO CIENTÍFICO	26
ANEXOS.....	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BHI	Braian Heart Infusion
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization e Time-Of-Flight
PCR	Polymerase Chain Reation
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
WHO	World Health Organization
EPI's	Equipamentos de Proteção Individual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de swabs traqueais e cloacais em aves de produção de granjas avícolas para pesquisa de *Gallibacterim anatis* submetidas a PCR.

Tabela 2. Análises individuais realizadas com amostras coletadas em aves de produção para pesquisa de *Gallibacterim anatis* em granjas avícolas.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é uma das atividades agropecuárias mais importantes para a economia brasileira, pois o país é o maior exportador mundial, com um pouco mais de 12 milhões de toneladas da carne de frango exportadas só no ano de 2018. O Brasil é também o segundo maior produtor avícola do mundo, no nordeste o estado de Pernambuco tem se destacado como um dos grandes produtores avícolas do país, por isso a avicultura é uma atividade importante para a economia do Estado (SILVA et al., 2015; ABPA, 2019). O que torna o controle de doenças infecciosas na avicultura algo de fundamental importância, principalmente aquelas que afetam a produção (ARMOUR; PULIDO- LANDÍNEZ, 2019).

As doenças infecciosas podem provocar sérios prejuízos na produção avícola, sendo responsáveis por grandes perdas tanto na produção de frangos de corte quanto nas aves de postura, o que resulta em elevados gastos e quedas na produção (ANDREATTI, 2007; ALBINO et al., 2017).

Neste contexto *Gallibacterium anatis* tem surgido como agente infeccioso emergente, que pode estar diretamente relacionado com decréscimo na produção de ovos, baixa conversão alimentar, pode causar septicemia e até mesmo aumento da mortalidade nas plantéis avícolas (BOJESSEN et al., 2003; JONES et al., 2013). As infecções por *G. anatis* nas de aves de produção podem causam problemas respiratórios, reprodutivos e também digestivos, que como consequência levam a retardo no desenvolvimento, baixa conversão alimentar e decréscimo na produção de ovos (SINGH et al., 2016), no entanto, a patogenia da infecção por este agente ainda não está totalmente esclarecida, nem mesmo a sua interação com o hospedeiro (BISGAARD,1993; KRISTENSEN et al., 2012; ARMOUR; PULIDO- LANDÍNEZ, 2019).

Este agente é considerado cosmopolita, e geralmente está associado a outros patógenos, o que dificulta seu diagnóstico, pois muitas vezes, por apresentar sinais inespecíficos, pode ser confundido com outras doenças como: Coriza Infecciosa, Influenza Aviária, Cólera Aviária, entre outras. (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2007; SINGH et al., 2016). A transmissão e disseminação de *G. anatis* podem ocorrer tanto de forma horizontal, quanto de forma vertical, e também por vias transovariana e venérea (NEUBAUER et al., 2009).

Algumas enfermidades prévias, como doenças respiratórias e reprodutivas podem favorecer a infecção e disseminação sistêmica do patógeno. A doença causada por *G. anatis* já foi relatada em perus, gansos, faisões, perdizes, periquitos, pavão e pequenas aves de gaiola (NEUBAUER et al., 2009; JONES et al., 2013) e também já foi relatada causando septicemia em um paciente humano, por isso pode ser considerada também como uma zoonose (AUBIN et al., 2013).

No Brasil ainda não existem relatos ou dados sobre *Gallibacterium anatis* na produção avícola, mesmo este tendo sido considerado relevante na produção avícola mundial, por isso são indispensáveis estudos que possam ajudar no diagnóstico etiológico com esclarecimentos sobre sua ocorrência e importância, o que torna necessária a realização desta pesquisa, pois a mesma pode ajudar a colocar este patógeno entre os diagnósticos diferenciais das doenças respiratórias, reprodutivas e digestivas das aves de produção, o que pode ajudar a reduzir os prejuízos econômicos possivelmente causados por este patógeno na avicultura do estado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção avícola mundial, com uma produção anual que ultrapassa 13,6 mil toneladas da carne de frango e chega a exportar um terço deste montante para um pouco mais de 150 mercados importadores da produção brasileira (ABPA, 2019), também responde por cerca 3,3% da produção de ovos no mundo. A produção brasileira de ovos de galinha chega a totalizar 49,05 bilhões de ovos, um número que cresce a cada ano (FAO, 2018, EMBRAPA, 2020). O país é o maior exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor avícola do mundo, o quinto no ranking da produção mundial de ovos, e atualmente o estado de Pernambuco ocupa a oitava colocação no ranking de produção nacional contribuindo com 6% da produção nacional, este crescimento tem sido impulsionado cada vez mais pela aplicação das inovações tecnológicas, seleção genética, nutrição e controle sanitário, apoiados por pesquisas científicas aplicadas ao setor com o intuito de garantir a qualidade e eficiência produtiva da atividade avícola (EMBRAPA, 2020; PROCÓPIO & LIMA, 2020).

Com a importância da avicultura para a economia brasileira, foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que fornece diretrizes exequíveis para a sanidade avícola dos plantéis brasileiros, além de Instruções Normativas, com a finalidade de garantir a qualidade final do produto na mesa dos consumidores (ABPA, 2019).

O controle das doenças nos plantéis avícolas são estratégias importantes para garantir a eficiência produtiva, principalmente daquelas causadas por patógenos que podem afetar diretamente a produção, causar risco a saúde dos consumidores, e até mesmo levar a embargos e prejudicar o livre comércio dos produtos de origem aviária nos mercados já alcançados (ALBINO et al., 2017).

2.1. Patógenos emergentes

Os patógenos emergentes têm assumido importante papel no cenário atual, pois estes que não eram considerados relevantes, chegam a causar sérios prejuízos na produção avícola e tornam-se protagonistas, causadores de enfermidades que podem levar a sérias perdas econômicas (ARMOUR & PULIDO-LANDÍNEZ, 2019), para estas existem dificuldades no seu diagnóstico, pois seus padrões de incidência, sua natureza epidemiológica e também riscos à saúde pública são muitas vezes desconhecidos, como resultado de terem sido negligenciados e considerados pouco relevantes, como consequência não há estudos mais detalhados, o que trás dificuldades para se chegar ao diagnóstico final para tomada de decisões mais precisas, com isso geralmente são necessários o uso de técnicas com maior sensibilidade e especificidade, como as técnicas moleculares, como a extração do material genético e amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outras técnicas (NEUBAUER et al., 2009; SINGH et al., 2016).

Gallibacterium anatis foi por muito tempo considerada como microrganismo comensal nas aves de maneira geral, porém muitos autores tem relacionado este agente com doenças e perdas produtivas nas aves de produção, o que tem tornado este agente o objeto de estudo, com alguns relatos em diversas partes do mundo, no entanto, ainda não é completamente esclarecida a sua patogenia e interação com o hospedeiro, porém esta bactéria tem deixado de ser considerada comensal e passou a ser considerada como agente patogênico (SINGH et al.,

2016).

Diversos estudos têm sido realizados para melhor compreensão em relação a fatores de virulência que justifiquem sua ação patogênica no organismo das aves e também de outras espécies, estas pesquisas tem ajudado a chegar numa melhor compreensão, o que facilitará para a produção de imunógenos e drogas eficientes contra *G. anatis*, que já tem se mostrado resistente a diversos antibioticos utilizados na rotina (SINGH et al., 2016; ARMOUR, PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

2.2. Epidemiologia

Gallibacterium anatis é um patógeno que naturalmente habita o trato respiratório e de forma oportunista pode se propagar para outros sistemas, como digestório e reprodutivo das aves, sua disseminação pode ocorrer por aerossóis, secreções respiratórias ou digestivas/reprodutivas, que podem contaminar o alimento, água ou ambiente e infectar todo lote, algumas pesquisas demonstram que este agente pode estar diretamente ou indiretamente relacionado ao adoecimento das aves, causando lesões como ooforite, salpingite, hepatite, peritonite, enterite, lesões do trato respiratório e até mesmo septicemia, estas lesões conseqüentemente podem levar ao decréscimo na produção de ovos, baixa conversão alimentar, retardo no crescimento e menor desenvolvimento da musculatura, como conseqüencia, em poedeiras comerciais e frangos de corte respectivamente, e também pode secundariamente provocar um aumento das taxas de mortalidade ou descarte (JONES et al., 2013; CHÁVEZ et al., 2017b; ARMOUR & PULIDO-LANDÍNEZ, 2019; YAMAN & SAHAN YAPICIER, 2019).

Ao longo da história os pesquisadores utilizaram diversas nomenclaturas para nomear as bactérias do gênero *Gallibacterium* como por exemplo “*Cloaca bactéria*” por Kjos-Hanssen (1950), *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella anatis*, *Mannheimia haemolytica* e *Actinobacillus salpingitidis*, mas atualmente o gênero foi estabelecido como *Gallibacterium*, dentro da família das *Pasteurellaceae*, que foi classificado possuindo cinco espécies diferentes, *Gallibacterium anatis*, *G. melopsittaci*, *G. salpingitidis*, *G. trehalosifermentans* e três *genomospecies* (*G. genomospecies 1, 2 e 3*) (BISGAARD, 1982; CHRISTENSEN et al., 2003, BOJESEN et al., 2003; BISGAARD et al., 2009, EL-ADAWY et al., 2018).

As bactérias do gênero *Gallibacterium* Já foram relatadas em todos os continentes em diferentes países, como Suíça, Dinamarca (BOJESEN et al., 2007), Alemanha (EL-ADAWY et al., 2018), Áustria (PAUDEL et al., 2014), Nigéria, China, Índia e Japão, EUA (JOHNSON et al., 2013; WANG et al., 2016), Egito (EL-HAMID et al., 2016), Colômbia, Taiwan, Noruega, Austrália, Síria, Inglaterra, Suécia, República Tcheca, Perú, Argentina, México (CHÁVEZ et al., 2017b), Iran (ATAEI et al., 2017) e Turquia em aves de postura (YAMAN & SAHAN YAPICIER, 2019). Porém ainda não existem relatos de *G. anatis* no Brasil, por tanto este o primeiro estudo feito sobre o agente em aves de produção do país.

2.3. Transmissão e disseminação

A transmissão das bactérias do gênero *Gallibacterium* pode ocorrer tanto na forma horizontal por contato com aerossóis, secreções, dejetos ou utensílios contaminados (bebedouro, comedouro), quanto pela forma vertical por via transovariana e também como doença venérea, este patógeno pode acometer todas as espécies de aves e mamíferos incluindo o homem, e pode dar origem ou até mesmo agravar desordens respiratórias, reprodutivas e também digestivas tanto em frangos de corte como também em poedeiras comerciais. Em estudos experimentais esse agente foi capaz de causar hepatite, ooforite, salpingite, pneumonia, peritonite, enterite e hemorragia generalizada por septicemia, ocasionando decréscimo na produção e aumento na mortalidade das aves comerciais (PAUDEL et al., 2014; ARMOUR & PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

Fatores como estresse, idade do lote, imunossupressão, mudanças climáticas, influências hormonais e associação com outros patógenos podem contribuir para potencializar sua ação patogênica no organismo, importante ressaltar para este agente já existem relatos em diversas espécies, como aves de vida livre e domésticas, tanto ornamentais (psitacídeos, passeriformes, pavões e faisão) como de produção (frangos de corte, poedeiras comerciais e perus), e também em mamíferos incluindo o homem (AUBIN et al., 2013; KRISHNEGOWDA et al., 2020).

As infecções por *Gallibacterium anatis* podem ocorrer após o contato com aerossóis, secreções, e também por via transovariana ou transmissão venérea,

pode ocorrer também a auto infecção, pois este agente, que geralmente faz parte da microbiota do trato respiratório (KRISHNEGOWDA et al., 2020), quando em condições favoráveis ao agente, como debilidade imunológica por estresse, ou outras doenças prévias, podem se multiplicar e levar a ocorrência de sinais clínicos como: estertores pulmonar, secreções respiratórias, que podem causar decréscimo na produção. Este agente também causar lesões patológicas sistêmicas nos diversos órgãos como: pneumonia, pericardite, ooforite, salpingite, necrose hepática, nefrite, peritonite e enterite (ARMOUR & PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

As expressões de fatores de virulência como a produção da toxina GtxA, presença de fímbria F1fA, produção material capsular, secreção de metaloproteases, formação de biofilme e a capacidade de promover a hemaglutinação das hemácias, são provavelmente responsáveis pelas apresentações clínicas causadas pelo agente (ARMOUR & PULIDO-LANDÍNEZ, 2019). Muitas pesquisas tem sido realizadas com o intuito de identificar e esclarecer os fatores de virulência associados a *G. anatis* e sub espécies (PERSSON, et al., 2018), na tentativa de entender a ação patogênica do agente no organismo do hospedeiro que provocam lesões patológicas, mas são necessários mais estudos para entender completamente esta interação (KRISHNEGOWDA, et al., 2020).

Alguns fatores de virulência já relatados são: a produção da toxina GtxA – *Gallibacterium toxina A*, que tem atividade hemolítica e também apresenta leucotóxicidade (KRISTENSEN et al., 2012). A presença de fímbria F1fA– da família de fimbrias F17-like facilita adesão as células epiteliais (PERSSON, et al., 2018). A capacidade que *G. anatis* tem de produzir material capsular promove proteção, adesão e resistência ao patógeno causando maior persistência no hospedeiro (SINGH et al., 2016). A secreção de metaloproteases podem degradar as IgG das aves causando depleção do sistema imunológico destas (GARCIA-GOMEZ, et al., 2005; CHÁVES et al., 2017a)

A formação de biofilme composto por proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e proteínas amilóides é responsável por promover a persistência das infecções e levar a cronicidade da doença, causando diminuição da sensibilidade aos antibióticos (PERSSON & BOJESSEN, 2015).

Algumas cepas de *G. anatis* também tem a capacidade de produzir *Hemaglutininas* que podem promover a hemaglutinação das hemácias tanto de aves quanto de mamíferos (PERSSON & BOJESEN, 2015; MONTES-GARCÍA, et al., 2016; ARMOUR; PULIDO-LANDÍNEZ, 2019).

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico para infecções por *Gallibacterium anatis* pode ser realizado pela associação de sinais clínicos respiratórios como estertores e dificuldades respiratórias, sinais reprodutivos com decréscimo na produção de ovos, também é relatado que as aves podem desenvolver sinais digestivos (enterite) associados ao agente. O diagnóstico pode ser realizado através da colheita e análise de swabs traqueais, cloacais e de tecidos (pulmão, fígado, rins, intestino e aparelho reprodutivo) com lesões, coletados de aves no exame pós-morte, estas amostras devem ser encaminhadas para realização de cultivo, isolamento, avaliação das características morfológicas e bioquímicas das colônias (KRISHNEGOWDA et al., 2020).

Este agente é descrito como uma bactéria gram negativa, não móvel, em forma de coccobacilo e anaeróbio facultativa, que geralmente formam colônias de 0,5 a 1,5 mm de diâmetro, com a coloração transparente e brilhante, de formato convexa, com formação de halo por beta hemólise em ágar sangue a depender da subespécie (*hemolítica* ou *não hemolítica*), em ágar Macconkey formam colônias rosadas (fermentadoras de lactose), convexas e brilhantes (BOJESEN et al., 2003). Esta *Pasteurellacea* pode ser diferenciada das demais do seu grupo por meio de provas bioquímicas como: catalase e oxidase positivas, urease e indol negativos e fermentação de glicose (CHRISTENSEN et al., 2003).

Diversas técnicas podem ser utilizadas, tanto para diagnóstico direto, por meio de análise molecular do material genético provenientes de swabs cloacais, e/ou traqueais, fragmentos de tecidos (fígado, rim, pulmão, coração, trato reprodutivo e digestivo), ou indireto, por meio de cultivo, isolamento e extração do DNA das colônias para amplificação do DNA bacteriano, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou em tempo real, com revelação do material genético amplificado em gel de agarose a 1,5% com blue green (EL-ADAWY et al., 2018; KRISHNEGOWDA et al., 2020), outros testes

moleculares também podem ser empregado para o diagnóstico de *G. anatis* como exames macro e microscópicos de órgãos afetados, imuno-histoquímica e hibridação *in situ*, espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF) (PAUDEL et al., 2014), hibridação DNA-DNA, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), análise de rRNA 16S e genes de seqüenciamento como *infB*, *recN* e *rpoB* (BISGAARD, 2009).

2.5. Tratamento e Controle

O tratamento das infecções causadas por *G. anatis*, não é uma tarefa simples, pois o mesmo têm se destacado por sua multirresistência a antimicrobianos que rotineiramente são utilizados na avicultura ou que estão disponíveis no mercado (betalactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, sulfonamidas e outros), por isso, existe a necessidade da realização de cultivo microbiológico, identificação e a realização de antibiograma para um tratamento com maior precisão, com antibióticos que apresente sensibilidade, nos casos de infecção por este agente (CHÁVEZ et al., 2017b). Para o seu controle se faz necessário reforço ou implementação de práticas sanitárias mais rigorosas e utilização de antibióticos para tratamento e controle mediante a realização de cultivo com antibiograma (CHÁVEZ et al., 2017a), assim como os cuidados sanitários devidos com equipe de trabalho, a limpeza e desinfecção dos ambientes, utensílios, equipamentos, tratamento ou a não reutilização da cama de frango (EL-ADAWY et al., 2018).

3. OBJETIVOS

Geral

Pesquisar *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas do estado de Pernambuco.

Específicos

- Isolar e identificar por características morfotintoriais e bioquímicas *G. anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais saudáveis e com sinais clínicos respiratórios, digestivos ou reprodutivos;
- Detectar por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) *G. anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais;
- Avaliar a ocorrência de *G. anatis* em granjas de frangos de corte e poedeiras comerciais;
- Verificar a relação da presença de *G. anatis* com os sinais clínicos apresentados pelas aves.

4. REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2019. Acesso em 28/08/2019. Disponível em: [http:// http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo](http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo).

ALBINO, L.F.T.; BARROS, V.R.S.M.; MAIA, R.C.; TAVERNARI, F.C. **Produção e Nutrição de Frangos de Corte**. 2. Ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2017. 360p.

ANDREATTI, R. . 2007. Paratifo Aviário. In: ANDREATTI, R. L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007, p. 112-117.

ARMOUR, N. K.; PULIDO-LANDÍNEZ, M. *Gallibacterium anatis* - um patógeno emergente na avicultura? **AviNews, Brasil**, v 9. n.1, p. 75–83, 2019.

ATAEI, S.; BOJESEN, A.M.; AMININAJAFI, F.; RANJBAR, M.M.; BANANI, M.; AFKHAMNIA, M.; ABTIN, A.; GOODARZI, H. First report of *Gallibacterium* isolation from layer chickens in Iran. **Archives of Razi Institute**, v. 72, n. 2, p.123-128,2017.

AUBIN, G.G.; HALOUN, A.; TREILHAUD, M.; REYNAUD, A.; CORVEC, S. *Gallibacterium anatis* Bacteremia in a Human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3897– 3899, 2013.

BISGAARD, M. Isolation and characterization of some previously unreported taxa from poultry with phenotypical characters related to *Actinobacillus*-an *Pasteurella* species. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 59–67, 1982.

BISGAARD, M. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v. 279, n. 1, p. 7–26, 1993.

BISGAARD, M.; KORCZAK, B. M.; BUSSE, H. J.; KUHNERT, P.; BOJESEN, A. M.;CHRISTENSEN, H. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 735–744, 2009.

BOJESEN, A. M.; TORPDAHL, M.; CHRISTENSEN, H.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2737–2740, 2003.

BOJESEN, A. M.; VAZQUEZ, M. E.; ROBLES, F.; GONZALEZ, C.; SORIANO, E. V.;OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1–3, p. 262–268, 2007.

CHÁVEZ, R.F.O.; BARRIOS, R.M.M.; XÓCHIHUA, J.A.M.; CHÁVEZ, J.F.H.; LEÓN, B.J. L.; YANES, M.A.; MARTÍNEZ, V.A.F.; MASCAREÑO, J.R.; ESCALANTE, J.G.A.I. Antimicrobial resistance of *Gallibacterium anatis* isolates from breeding and laying commercial hens in Sonora, Mexico. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v.8, n.3, p. 305-312, 2017a.

CHÁVEZ, R.F.O.; BARRIOS, R.M.M.; CHÁVEZ, J.F.H., MASCAREÑO, J.R.; ESCALANTE, J.G.A.I.; YANES, M.A. First report of biovar 6 in birds immunized against *Gallibacterium anatis* in poultry farms located in Sonora, Mexico. **Veterinaria México OA**, v. 4, n. 3, p. 4– 11, 2017b.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M.; BOJESSEN, A.M.; MUTTERS, R.; OLSEN, J.E. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen . nov ., comb . nov . and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen . nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 275–287, 2003.

EL-ADAWY, H.; BOCKLISCH, H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H. M.; HOTZEL, H. Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry. **Irish Veterinary Journal**, v. 71, n. 5, p.1-10, 2018.

EL-HAMID, H.A.; ELLAKANY, H. F.; BEKHEET, A.A.; ELBESTAWY, A.R.; MATARIED, N. Pathogenicity of Tem *Gallibacterium anatis* in commercial broiler chickens. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**. v. 49, n. 2, p. 42-49, 2016

EMBRAPA. 2020. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção Avícola**. Acesso em 22/05/2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-de-aves/producao-de-aves/producao./http://indicadores.agricultura.gov.br/ agrostat/index.htm>

FAO. Food Agricultural Organization. Statistical – Database. Acesso em: 06/04/2020. Disponível em: <http://www.fao.org>.

GARCIA-GOMEZ, E.; VACA, S.; PÉREZ-MÉNDEZ, A.; CABALLERO, J.I.; MARQUEZ, V.P.; TENORIO-GUTIÉRREZ, V.; NEGRETE-ABASCAL, E. *Gallibacterium anatis* -secreted metalloproteases degrade chicken IgG. **Avian pathology**. v. 34, n. 5, p. 426-429, 2005.

JOHNSON, T.J.; DANZEISEN, J.L.; TRAMPEL, D.; NOLAN, L.K.; SEEMANN, T.; BAGER, R.J.; BOJESSEN, A.M. Genome Analysis and Phylogenetic Relatedness of *Gallibacterium anatis* Strains from Poultry. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2013.

JONES, K.H.; THORNTON, J.K.; ZHANG, Y.; MAUEL, M.J. Research Notes A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. **Poultry Science**, v. 92, n. 12, p. 3166–3171, 2013.

KJOS-HANSEN, B. Oviduct peritonitis in hens due to pathogenic 'cloacal bacteria'. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 2, p. 523 – 531, 1950.

KRISHNEGOWDA, D.N.; DHAMA, K.; MARIAPPAN, A.K.; MUNUSWAMY, P.; YATOO, M.I.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; BHATT, P.; REDDY, M.R. Etiology, epidemiology, pathology, and advances in diagnosis, vaccine development, and treatment of *Gallibacterium anatis* infection in poultry: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 40, n. 1, p. 16-34. 2020.

KRISTENSEN, B.M.; SINHA, S.; BOYCE, J.D.; BOJESEN, A.M.; MELL, J.C.; REDFIELD, R. J. Natural transformation of *Gallibacterium anatis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4914-4922, 2012.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L. Doenças respiratórias aviárias atendidas no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, Brasil, durante os anos de 2005 a 2006. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 219-225, 2007.

MONTES-GARCÍA, J.F.; VACA, S.; VAZQUEZ-CRUZ, C.; SORIANO-VARGAS, E.; AGUILAR-ROMERO, F.; BLACKALL, P.J.; NEGRETE-ABASCAL, E. Identification of a Hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 450-456, 2016.

NEUBAUER, C.; SOUZA-PILZ, M.; BOJESEN, A. M.; BISGAARD, M.; HESS, M. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. **Avian pathology**, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2009.

PAUDEL, S.; LIEBHART, D.; AURICH, C.; HESS, M.; HESS, C. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 2. Epididymitis and decreased semen quality are the predominant effects in specific pathogen free cockerels. **Avian Pathology**, v. 43, n. 6, p. 529–534, 2014.

PERSSON, G.; BOJESEN, A. M. Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. **Veterinary Research**, v. 46, n. 57, p. 1-11, 2015.

PERSSON, G.; PORS, S. E.; THØFNER, I. C. N.; BOJESEN, A. M. Vaccination with outer membrane vesicles and the fimbrial protein FliA offers improved protection against lesions following challenge with *Gallibacterium anatis*. **Veterinary Microbiology**, v. 217, n. 1, p. 104- 111, 2018.

PROCÓPIO, D. P.; LIMA, H. D'A. Avaliação conjuntural da avicultura no Brasil. **Research Society and Development**, v. 9, n. 3, p. 1-12, 2020.

SINGH, S.V.; SINGH, B.R.; SINHA, D.K.; OR, V.K.; VADHANA, A.P.; BHARDWAJ, M.; DUBEY, S. *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 7, n. 3, p. 1–7, 2016.

SILVA, T.P. N.; HÉLITON, P.; CRISTIANE, G.; ALMEIDA, G.L.P.; NICOLY, F.G. Artigo técnico: tipologia de instalações avícolas na região agreste de pernambuco. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural**, v. 35, n. 4, p. 789–799, 2015.

WANG, C.; ROBLES, F.; RAMIREZ, S.; RIBER, A.B. BOJESEN, A.M. Culture-independent identification and quantification of *Gallibacterium anatis* (*G. anatis*) by real-time quantitative PCR. **Avian Pathology**, v. 45, n. 5, p. 538–544, 2016.

YAMAN, S; SAHAN YAPICIER, O. Diagnosis of *Gallibacterium Anatis* in Layers: First report in Turkey. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.21, n. 3, p. 1-8, 2019.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 Artigo 1

Primeiro relato da ocorrência de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais em granjas avícolas, no Brasil.

Órion Pedro da Silva^{1*}, Mércia Rodrigues Barros¹.

ABSTRACT.- Da Silva, Ó.P., Barros, M.R. 2020. [First report of the occurrence of *Gallibacterium anatis* in broilers and laying hens in poultry farms, in Brazil.] **Primeiro relato da ocorrência de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas, no Brasil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: orionpatologiaveterinaria@gmail.com

Poultry farming is among the activities agricultural activities of greater importance to the Brazilian economy, as well as for the state of Pernambuco. Therefore, disease control that may interfere with production is essential, and numerous emerging diseases have emerged, caused by several pathogens, among which is *Gallibacterium anatis*, which was initially described as a commensal agent in the respiratory, digestive and reproductive tract of birds, however, there are countless reports relating to this pathogen with economic losses in commercial production. Given the above, the objective was to research *G. anatis* in broilers and laying hens in poultry farms in the state of Pernambuco, Brazil. For convenience, 20 lots of different poultry farms were selected, of which 10 were broilers and 10 commercial laying hens, in each batch, at random, 10 swabs, five tracheal and five cloacals, were collected from randomly selected birds, totaling 200 samples. The swab samples collected were kept in Brain Heart Infusion (BHI) broth, and sent to the laboratory for cultivation and microbiological isolation, Gram stain, catalase and biochemical tests. They were isolated 366 bacterial colonies, of which 227 were selected through morphotintorial characteristics and biochemical tests. And after genetic material was extracted through the Promega® Commercial Kit, end the isolated colonies, was performed through thermal extraction, and subsequently subjected to polymerase chain reaction (PCR). The results obtained detected *G. anatis* in 41 swab samples, 29 of which were tracheal and 12 of cloaca, and in 33 of the selected colonies, they were confirmed. The bacterium *G. anatis* was present in (75%) of the surveyed lots, which has a pathological potential reported in several surveys, which suggest that it is a potential threat in poultry production, which can lead to economic losses in the activity. Besides that this agent also has zoonotic potential, which makes it relevant to public health.

INDEX-TERMS: *Gallibacterium anatis*, poultry farming, emerging pathogen, zoonosis.

¹Recebido em ...

Aceito para publicação em ...

² Departamento de Medicina Veterinária – Área de Patologia Animal, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência: orionpatologiaveterinaria@gmail.com

RESUMO.- [Primeiro relato da ocorrência de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas avícolas, no Brasil] A avicultura está entre as atividades agropecuárias de maior importância para a economia brasileira, assim como para o estado de Pernambuco. Por isso, o controle de doenças que possam interferir na produção é essencial, e inúmeras doenças emergentes têm surgido, causadas por diversos patógenos, dentre os quais está o *Gallibacterium anatis*, que foi descrito inicialmente como agente comensal do trato respiratório, digestivo e reprodutivo das aves, porém existem inúmeros relatos relacionando a este patógeno com prejuízos econômicos na produção comercial. Diante do exposto, objetivou-se pesquisar *G. anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais em granjas avícolas no estado de Pernambuco, Brasil. Foram selecionados por conveniência 20 lotes de diferentes granjas avícolas, das quais 10 eram de frangos de corte e 10 de poedeiras comerciais, em cada lote, de forma aleatória, foram coletados 10 swabs, cinco traqueais e cinco cloacais, de aves selecionadas aleatoriamente, totalizando 200 amostras. As amostras de swabs coletadas foram conservadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), e encaminhadas ao laboratório para cultivo e isolamento microbiológico, coloração de Gram, catalase e provas bioquímicas. Foram isoladas 366 colônias bacterianas, das quais 227 foram selecionadas através de características morfotintoriais e provas bioquímicas. E posteriormente foi realizada a extração do material genético por

meio do Kit comercial Promega®, direto dos caldos com swabs. E das colônias isoladas, foi realizada por meio da extração térmica, e posteriormente submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos detectaram *G. anatis* em 41 amostras de swabs sendo 29 traqueais e 12 cloacais, e em 33 das colônias selecionadas, foram confirmadas. A bactéria *G. anatis* esteve presente em (75%) dos lotes pesquisados, por isso sugerimos que é necessário um monitoramento com relação a este agente na produção avícola, o qual apresenta um potencial patológico relatado em diversas pesquisas, as quais sugerem que o mesmo é uma potencial ameaça na produção avícola, que pode levar a perdas econômicas na atividade. Além disso este agente também possui potencial zoonótico, o que o torna relevante para a saúde pública.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Gallibacterium anatis*, avicultura, patógeno emergente, zoonose.

INTRODUÇÃO

As doenças causadas por agentes infecciosos provocam sérios prejuízos para a produção avícola, e são responsáveis por perdas na produção de frangos de corte e também nas galinhas de postura, isso resulta em gastos elevados com quedas na produção (Albino et al. 2017).

Gallibacterium anatis é um agente infeccioso emergente descrito anteriormente como comensal do trato respiratório superior e reprodutivo inferior de aves saudáveis (Armour & Pulido-Landínez 2019), porém alguns pesquisadores relatam que este agente pode causar septicemia, provocar lesões e estar diretamente relacionado com decréscimo na produção de ovos, baixa conversão alimentar e aumento da mortalidade (Bojesen et al. 2003, Jones et al. 2013, Armour & Pulido-Landínez 2019).

A infecção por *Gallibacterium anatis* nas aves de produção, geralmente causam problemas respiratórios, reprodutivos e digestivos que podem provocar retardo no desenvolvimento, baixa conversão alimentar e decréscimo na produção de ovos (Singh et al. 2016), no entanto a patogenia da infecção por este agente ainda não é totalmente esclarecida, nem mesmo a sua interação com o hospedeiro (Bojesen et al. 2003, Neubauer et al. 2009, Kristensen et al. 2012).

Este agente é considerado cosmopolita, e geralmente está associado a outros patógenos, o que dificulta seu diagnóstico, e muitas vezes pode até ser confundida com outras doenças que causam alterações semelhantes (Christensen et al. 2003, Singh et al. 2016). A transmissão e disseminação de *Gallibacterium anatis* geralmente ocorre de forma horizontal, mas a forma vertical também acontece por via transovariana e também de forma venérea (Neubauer et al. 2009). Enfermidades prévias, como doenças respiratórias e reprodutivas favorecem a disseminação sistêmica do patógeno. Este agente já foi relatado em perus, gansos, faisões, perdizes, periquitos, pavões e aves de gaiolas (Neubauer et al. 2009, Jones et al. 2013) pode ser considerada zoonose, por ter sido relatada causando septicemia em um paciente humano (Aubin et al. 2013).

Não existem relatos sobre *Gallibacterium anatis* no estado de Pernambuco ou no Brasil em aves de produção ou ornamentais, apesar de ser relatada e considerada por diversos pesquisadores como relevante para a produção avícola mundial, por isso se tornam indispensáveis pesquisas que contribuam com o diagnóstico e possam esclarecer sobre sua ocorrência, o que tornou necessária a realização desta pesquisa, pois com o resultado da mesma podemos sugerir que *G. anatis* esteja entre os possíveis diagnósticos diferenciais para as doenças respiratórias, reprodutivas e digestivas nas aves de produção, e como consequência contribuir para a redução dos prejuízos econômicos possivelmente causados por este patógeno na avicultura do estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem - 20 lotes de diferentes granjas avícolas foram selecionados por conveniência, sendo 10 de frangos de corte e 10 de poedeiras comerciais, localizadas no estado de Pernambuco, Brasil. A colheita das amostras foi realizada por conveniência de acordo com a disponibilidade das granjas, em lotes de frangos de corte e poedeiras comerciais, saudáveis ou que apresentavam sinais clínicos respiratório, digestivo e/ou reprodutivo, e no momento da colheita das amostras foi aplicado um questionário investigativo em cada granja visitada.

Colheita das amostras - Foram colhidas um total de 200 amostras de swabs dos 20 lotes analisados, provenientes de 100 aves, das quais 50 eram de frangos de corte e 50 de poedeiras comerciais, com diferentes idades, totalizando 100 amostras de swabs traqueais e 100 amostras de swabs cloacais, sendo coletado 10 swabs de cada lote, sendo cinco traqueais e cinco cloacais, que foram armazenados e transportados em caixas isotérmicas com gelo reciclável até a chegada no laboratório para o processamento.

Oito aves comerciais de lotes com sinais clínicos, sendo quatro frangos de corte e quatro poedeiras comerciais foram selecionadas para exame necroscópico, destas foram colhidas amostras de swabs traqueais e cloacais, em seguida foram submetidas à eutanásia de acordo com a resolução N° 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CRMV) e analisadas por exame necroscópico, para identificação de lesões macroscópicas.

Os swabs coletados da traquéia e cloaca foram conservados em caldo brain heart infusion (BHI), mantidos sob refrigeração em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas para serem processadas na Área de Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), nos Laboratórios de Inspeção de Carne e Leite, e de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Cultivo bacteriológico - As amostras de swabs traqueais e cloacais conservadas em caldo BHI, foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas, em seguida as amostras foram semeadas em duplicata, em ágar sangue de carneiro a 5% e ágar MacConkey, e incubadas sob condições de microaerofilia a 37°C por 24 a 48 horas. Posteriormente as colônias foram identificadas morfológicamente com relação às características macroscópicas como: cor, forma, tamanho, crescimento e aspecto, e submetidas a coloração de Gram para verificar suas características morfotintoriais, as colônias de cor cinza, côncavas, entre 1-3mm, crescimento focal e aspecto transparente, com beta hemólise no ágar sangue e roseas no ágar MacConkey, foram selecionadas e submetidas a testes bioquímicos de catalase, urease, indol e oxidase (Christensen et al. 2003). Após, as colônias suspeitas foram armazenadas em caldo BHI com 20% de glicerina e estocadas no freezer a -20°C.

Extração de material genético - Para extração do DNA direta dos caldos BHI com swabs foi utilizado o Kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. E das colônias suspeitas isoladas foram colocadas três alçadas em 100ml de H₂O ultra pura, para extração térmica segundo Fan et al. (1995), com as etapas de aquecimento no banho seco a 95°C por 15 minutos, em seguida para congelamento no freezer à -20°C por 1h, seguindo de centrifugação por 3 minutos a 15.000 rpm e separação do sobrenadante com o DNA bacteriano liberado, quantificado e armazenado em freezer -20°C para posterior análise.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - A análise molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase foi realizada para detecção de *Gallibacterium anatis*, utilizando uma cepa padrão (A-2016/956) gentilmente cedida por Paudel et al. (2014) advinda da Dinamarca, para uso como controle positivo e padronização da reação. Os primers utilizados foram o 1133fgal (TATTCTTTGTTACCARGG) e 114r (GGTTTCCCCATTCCGG) que são direcionados aos genes 16S rRNA e 23S rRNA (Bojesen et al. 2007). A PCR foi realizada tanto para análise direta dos caldos BHI com swabs, quanto para confirmação das colônias com características de *G. anatis*, de acordo com a metodologia utilizada por Atei et al. (2017), com um aquecimento para desnaturação inicial de 95° por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão, finalizando com 72°C por 10 minutos para extensão final.

Em seguida, o produto de DNA amplificado foi revelado em gel de agarose a 1,5%, submetido às condições de eletroforese a 80 volts durante 50 minutos e visualizados com *Bluegreen®* sob luz ultravioleta e foto documentado pelo sistema de documentação de gel.

Aspectos éticos - O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e aprovado com certificado nº 008028/2018-65.

RESULTADOS

Dos lotes de aves comerciais analisados, 75,0% (15/20) foram positivos para *Gallibacterium anatis*, destes, nove eram de poedeiras comerciais e seis de frangos corte, dos quais quatro apresentavam sinais clínicos respiratório, digestivo ou reprodutivo, com aumento da mortalidade (>5,0%), desses quatro dois eram frangos de corte e dois de poedeiras comerciais (Tabela 1), foi observado também um aumento do número de aves positivas nos lotes tanto de frangos de corte, como nos lotes de poedeiras comerciais com sinais clínicos respiratório e digestivo, quando comparado com aves saudáveis.

Das aves analisadas, 34,0% (34/100) amostras foram positivas na análise direta por PCR dos caldos BHI com amostras de swab, tanto proveniente da traquéia quanto da cloaca, sendo 22 da traquéia, cinco da cloaca e sete positiva em ambos, e destas, 29 eram de swabs traqueais e 12 de swabs cloacais, totalizando 41 amostras positivas.

Nas análises das colônias bacterianas foram isoladas 366 colônias, e após análises morfológicas e bioquímicas, 227 foram selecionadas como suspeitas para *G. anatis*. Do DNA extraído de todas as colônias supeitas e submetidas a PCR, 43 colônias amplificaram seu material genético e foram consideradas positivas para *G. anatis*, das quais 24 foram provenientes de traqueia e 19 de cloaca, de 28 aves, sendo estas 12 poedeiras comerciais e 16 frangos de corte.

Na análise direta do material genético extraído de swabs coletados de poedeiras comerciais, em que 50

swabs eram traqueais e 50 cloacais; 26,0% (26/100) foram positivos, destas 21 foram positivas nas amostras da traqueia e cinco nas amostras de cloaca. Das 50 aves analisadas, 46,0% (23/50) foram positivas (Tabela 2).

Nos frangos de corte, 100 amostras de swabs, sendo 50 traqueais e 50 cloacais, foram coletadas para análise, e destas 15,0% (15/100) foram positivas para *G. anatis*, das quais oito foram provenientes das amostras de traqueia e sete das amostras da cloaca. Considerando cada ave coletada individualmente, dos 50 frangos de corte analisados 22,0% (11/50) foram positivos (Tabela 2).

Tabela 1. Amostras de swabs traqueais e cloacais em aves de produção de granjas avícolas para pesquisa de *Gallibacterium anatis* submetidas a PCR.

Lote /Tipo	Idade (dias /semanas)	Sinais clínicos	Tipos de sinais	Frequência absoluta (FA)	Frequência Relativa (FR) %
1. Corte	20 dias	Não	-	0	-
2. Corte	22 dias	Não	-	1	1,0%
3. Corte	35 dias	Sim	Digestivo e baixa conversão	2	2,0%
4. Corte	8 dias	Não	-	0	-
5. Corte	22 dias	Não	-	1	1,0%
6. Corte	18 dias	Não	-	0	-
7. Corte	20 dias	Não	-	0	-
8. Corte	25 dias	Não	-	1	1,0%
9. Corte	36 dias	Não	-	1	1,0%
10. Corte	43 dias	Sim	Respiratórios e digestivos	5	5,0%
11. Poedeira	60 semanas	Não	-	0	-
12. Poedeira	90 semanas	Sim	Mortalidade alta (>5%)	4	4,0%
13. Poedeira	46 semanas	Não	-	2	2,0%
14. Poedeira	92 semanas	Não	-	2	2,0%
15. Poedeira	45 semanas	Não	-	2	2,0%
16. Poedeira	56 semanas	Sim	Respiratório e queda de produção	2	2,0%
17. Poedeira	53 semanas	Não	-	1	1,0%
18. Poedeira	91 semanas	Não	-	3	3,0%
19. Poedeira	92 semanas	Não	-	3	3,0%
20. Poedeira	38 semanas	Não	-	4	4,0%
Total				34	34,0%

Tabela 2. Análises individuais realizadas com amostras coletadas em aves de produção para pesquisa de *Gallibacterium anatis* em granjas avícolas.

Amostra	Resultado	Frequência relativa (FR)
Total de amostras	200	
Positivas na análise direta	41	20,5%
Traqueais	29	14,5%
Cloacais	12	6,0%
Total de Aves analisadas	100	
Positivas por análise direta (PCR)	34	34,0%
Positivas por análise indireta (Cultivo)	15	15,0%
Positivas sem sinais clínicos	21	21,0%
Positivas com sinais clínicos	13	13,0%
Total de colônias bacterianas isoladas	366	
Colônias bacterianas selecionadas para PCR	227	62,0%
Colônias bacterianas positivas na PCR	43	11,7%
Colônias bacterianas da traqueia	24	6,6%
Colônias bacterianas da cloaca	19	5,2%
Total de amostras de frangos de corte	100	
Positivas na análise direta (PCR)	15	15,0%
Traqueais	8	8,0%
Cloacais	7	7,0%
Frangos de corte positivos	11	22,0%
Total de amostras de poedeiras comerciais	100	
Positivas na análise direta (PCR)	26	26,0%
Traqueais	21	21,0%
Cloacais	5	5,0%
Poedeiras comerciais positivas	23	46,0%

DISCUSSÃO

Gallibacterium anatis já foi isolado em todos os continentes, principalmente nos países que são grandes produtores avícolas como Estados Unidos, China e em alguns países da União Européia, mas não havia relato deste agente no Brasil. Porém os resultados desta pesquisa mostram que *G. anatis* também está presente nas aves de produção no nordeste do Brasil na região pesquisada, e pode estar nas demais regiões do país, no entanto ainda não foi relatado, pela escassez de estudos relacionados a esse agente este é o primeiro relato de *G. anatis* no país, outros autores como Ataei et al. (2017) que relataram a presença do agente pela primeira vez no Iran em galinhas de postura que apresentavam queda na postura e aumento na mortalidade, fato que também foi observado durante este estudo, que nas criações de poedeiras comerciais positivas para *G. anatis* apresentavam sinais clínicos respiratórios e reprodutivos, já Yaman & Sahan Yapicier (2019) ao estudarem 31 bandos de aves poedeiras comerciais nas cidades de Afyonkarahisar, Kütahya, Gaziantep, na Turquia, apresentando doenças respiratórias, problemas reprodutivos e aumento da mortalidade detectaram pela primeira vez a presença de *G. anatis* relacionando-o ao decréscimo da produção nesses bandos, em outro estudo feito por Nassik et al. (2019) também foi verificado a presença de *G. anatis* no Marrocos, em bandos de galinhas poedeiras comerciais com diminuição no desempenho de produção e sinais clínicos respiratórios. Apesar desses relatos Krishnegowda et al. (2020) ressaltam a necessidade de estudos mais detalhados sobre a interação hospedeiro-patógeno nas co-infecções, fatores e genes de virulência, mecanismos moleculares, resistência bacteriana, assim como o impacto deste agente nas aves de produção.

Foi observado que para detecção de *Gallibacterium anatis* a análise direta do material genético de amostras do caldo BHI com swabs traqueais e cloacais por meio da PCR, apresenta maior sensibilidade para detecção do agente quando comparado com o cultivo e isolamento do mesmo, o que demonstra um certo grau de dificuldade, corroborando com a descrição feita por Christensen et al. (2007) e Krishnegowda et al. (2020), durante esta pesquisa, das 100 aves analisadas, 34 foram positivas na análise direta de swabs, enquanto que através do cultivo isolamento foi possível detectar 28 aves positivas.

A presença de *Gallibacterium anatis* em 75,0% (15/20) dos lotes analisados revela que este agente pode estar presente nas aves comerciais do estado, e uma vez presente tem a capacidade de atuar como patógeno primário e de maneira oportunista causar doenças que levem a prejuízos econômicos, este agente foi relatado por Chávez et al. (2017b) com um percentual de 3,83% de aves positivas para a *G. anatis* em poedeiras comerciais, previamente imunizadas contra o agente, isso provavelmente está relacionado ao fato de que alguns autores relatam que não há uma efetividade completa da vacina, possivelmente pela variedade genética apresentada pelo agente (Bojesen et al., Christensen et al. 2003) o que dificulta ainda mais seu controle.

Um número maior de amostras de aves positivas foram provenientes de traqueia, o que corrobora com as observações feitas por outros pesquisadores, os quais relatam que este agente pode fazer parte da microbiota do trato respiratório das aves (Bojesen et al. 2003). Durante esta pesquisa foi observado uma predileção do agente pelo trato respiratório, o que ocorreu de maneira mais acentuada nas poedeiras comerciais quando comparado com os frangos de corte, provavelmente pelo maior tempo de permanência destes lotes nos galpões. Krishnegowda et al. (2020), que isso favorece para que sob condições ideais ao patógeno como estresse, imunossupressão, doenças concomitantes prévias entre outras, o qual de maneira oportunista, pode se multiplicar, disseminar-se por todo organismo da ave e chegar a outros sistemas, provocando lesões no aparelho reprodutivo, trato digestivo e outros órgão ou sistemas. Observamos que os lotes que foram positivos para *G. anatis* e que apresentavam sinais clínicos, houve relato de queda da produção em dois lotes de poedeiras comerciais, e em dois lotes de frangos de corte houve redução da conversão alimentar, aumento da taxa de mortalidade ou descarte precoce das aves, corroborando com o que foi descrito por Jones et al. (2013) e Chavéz et al. (2017a), que relatam que isso pode resultar em prejuízos econômicos para os produtores.

Dos 20 lotes analisados, 10 de poedeiras comerciais e 10 de frangos de corte, foi observado que as poedeiras comerciais tiveram 90% (9/10) dos lotes infectados, quando comparados aos frangos de corte com 60% (6/10) dos lotes infectados, estando presente até mesmo quando estas não apresentavam sinais clínicos (respiratórios, queda na produção de ovos e mortalidade), diferente do que foi observado nos frangos de corte que ao apresentarem sinais clínicos (respiratórios, digestivos com retardo no crescimento), o número de aves positivas para o agente foi elevado, o que não corrobora com o estudo feito por El-Hamid et al. (2016) com 64 aves de produção, sendo 54 frangos de corte, seis galinhas de postura e cinco matrizes apresentando sinais clínicos respiratórios e reprodutivos, para a pesquisa de *Gallibacterium anatis* no Egito, e obteve 23,43% (15/64) de aves positivas após análise genética por PCR, isso pode acontecer por que os sinais clínicos provocados por este patógeno podem ser confundidos com outros agentes patogênicos, por isso *G. anatis* deve estar na lista dos diagnósticos diferenciais das doenças respiratórias, digestivas e reprodutivas nas aves de produção.

CONCLUSÕES

Gallibacterium anatis ocorre em frangos de corte e poedeiras comerciais, e este é o primeiro relato do agente no Brasil em aves de produção no estado de Pernambuco.

Nos lotes de frangos de corte que apresentaram sinais clínicos respiratório e digestivo, houve um número maior de aves positivas para *G. anatis*, com isso sugerimos que este agente entre na lista dos diagnósticos diferenciais das doenças respiratórias, digestivas e reprodutivas das aves de produção.

Para o diagnóstico de *G. anatis* sempre que possível deve-se utilizar técnicas com maior sensibilidade e especificidade como é o caso da PCR, que apresenta uma maior eficiência na detecção do agente quando comparado ao cultivo e isolamento bacteriano.

É necessário um monitoramento com relação a *G. anatis* na produção avícola, pois seu potencial patológico demonstrado em diversas pesquisas, alertam para sua ameaça na produção avícola, que pode levar a perdas econômicas na atividade. Além disso, este agente também possui potencial zoonótico o que torna-o relevante para a saúde pública.

Agradecimentos.- Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e aos avicultores do estado de Pernambuco por permitirem a realização da colheita do material biológico.

Declaração de conflito de interesse.- Não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- ALBINO L.F.T. BARROS V.R.S.M., MAIA R.C., TAVERNARI F.C., & SILVA D.L. Produção e Nutrição de Frangos de Corte. 2. ed. Viçosa, MG. Editora UFV, 2017. 360p.
- ARMOUR N. K. & PULIDO-LANDÍNEZ M. *Gallibacterium anatis* - Um patógeno emergente na avicultura? 2019. AviNews, Brasil. 9(1):75-83.
- ATAEI S., BOJESSEN A.M., AMININAJAFI F., RANJBAR M.M., BANANI M., AFKHAMNIA M., ABTIN A. & GOODARZI, H. 2017. First report of *Gallibacterium* isolation from layer chickens in Iran. Arch. Razi. Inst. 72(2):123-128. <<https://dx.doi.org/10.22092/ari.2017.109842>>
- AUBIN G.G., HALOUN A., TREILHAUD M., REYNAUD A. & CORVEC S. 2013. *Gallibacterium anatis* Bacteremia in a Human. J. Clin. Microbiol. 51(11):3897-3899. <<https://dx.doi.org/10.1128/JCM.01638-13>> <PMid:23966514>
- BOJESSEN A.M., TORPDAHL M., CHRISTENSEN H., OLSEN J.E. & BISGAARD M. 2003. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. J. Clin. Microbiol. 41(6):2737-2740. <<https://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.6.2737-2740.2003>> <PMid:12791918>
- BOJESSEN A.M., VAZQUEZ M.E., ROBLES F., GONZALEZ C., SORIANO E.V., OLSEN J.E. & CHRISTENSEN H. 2007. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. Vet. Microbiol. 123(1-3):262-268. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.013>> <PMid:17350770>
- CHÁVEZ R.F.O., BARRIOS R.M.M., XÓCHIHUA J.A.M., CHÁVEZ J.F.H., LEÓN B.J.L., YANES M.A., MARTÍNEZ V.A. F., MASCAREÑO J.R. & ESCALANTE J.G.A.I. 2017a. Antimicrobial resistance of *Gallibacterium anatis* isolates from breeding and laying commercial hens in Sonora, Mexico. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 8(3):305-312. <<https://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i3.4506>>
- CHÁVEZ R.F.O., BARRIOS R.M.M., CHÁVEZ J.F.H., MASCAREÑO, J.R., ESCALANTE J.G.A.I. & YANES M.A. 2017b. First report of biovar 6 in birds immunized against *Gallibacterium anatis* in poultry farms located in Sonora, Mexico. Vet. Méx. OA. 4(3):4-11. <<https://dx.doi.org/10.21753/vmoa.4.3.389>>
- CHRISTENSEN H., BISGAARD M., BOJESSEN A. M., MUTTERS R. & OLSEN J. E. 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies with in *Gallibacterium* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(1):275-287. <<https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02330-0>> <PMid:12656185>
- CHRISTENSEN H., KUHNERT P., BUSSE H.J., FREDERIKSEN W.C. & BISGAARD M. 2007. Proposed Minimal Standards for the Description of Genera, Species and Subspecies of the Pasteurellaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(1):166-178. <<https://dx.doi.org/10.1099/ij.s.0.64838-0>> <PMid:17220461>
- EL-HAMID H.A., ELLAKANY H.F., BEKHEET A.A., ELBESTAWY A.R. & MATARIED N. 2016. Pathogenicity of ten *Gallibacterium anatis* in commercial broiler chickens. AJVS. 49(2):42-49. <<https://dx.doi.org/10.5455/ajvs.224857>>
- FAN H.H., KLEVEN S.H. & JACKWOOD M.W. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases. 39(40):729-735. <<https://dx.doi.org/10.2307/1592409>> <PMid:8719206>
- JOHNSON T.J., DANZEISEN J.L., TRAMPEL D., NOLAN L.K., SEEMANN T., BAGER R.J. & OJESSEN A.M. 2013. Genome Analysis and Phylogenetic Relatedness of *Gallibacterium anatis* Strains from Poultry. PLoS ONE. 8(1):1-12. <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054844>> <PMid:23359626>
- JONES K.H., THORNTON J.K., ZHANG Y. & MAUEL M.J. 2013. Research Notes A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. Poult. Sci. 92(12): 3166-3171. <<https://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03321>> <Pmid:24235226>

- KRISTENSEN B.M., SINHA S., BOYCE J.D., BOJESEN A.M., MELL J.C. & REDFIELD R.J. 2012. Natural transformation of *Gallibacterium anatis*. AEM. 78(14): 4914-4922. <<https://dx.doi.org/10.1128/AEM.00412-12>> <PMid:2582057>
- KRISHNEGOWDA D.N., DHAMA K., MARIAPPAN A.K. MUNUSWAMY P., YATOO M.I., TIWARI R., KARTHIK K., BHATT P. & REDDY M.R. 2020. Etiology, epidemiology, pathology, and advances in diagnosis, vaccine development, and treatment of *Gallibacterium anatis* infection in poultry: a review. Vet. Quart. 40(1):16-34. <<https://dx.doi.org/10.1080/01652176.2020.1712495>> <Pmid:31902298>
- NASSIK S., TALLOUZT S., KARBACH N., TOUZANI C., BIDOUDAN Y., AAMARINE N. & HESS, C. 2019. First Report of Isolation of *Gallibacterium anatis* from Layer Chickens in Morocco with Decrease in Laying Performance Avian Diseases. 63(4):727-73. <<https://dx.doi.org/10.1637/aviandiseases-D19001119>> <Pmid:31865689>
- NEUBAUER C., SOUZA-PILZ M., BOJESEN A.M., BISGAARD M. & HESS M. 2009. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. Avian Pathol. 38(1):1-7. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450802577848>> <PMid:19089694>
- PAUDEL S., LIEBHART D., AURICH C., HESS M. & HESS, C. 2014. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch ' s postulates: 2 . Epididymitis and decreased semen quality are the predominant effects in specific pathogen free cockerels. Avian Pathol. 43(6):529-534. <<https://dx.doi.org/10.1080/03079457.967176>> <PMid:25246024>
- SINGH S.V., SINGH B.R., SINHA D.K., OR V.K., VADHANA A.P., BHARDWAJ M. & DUBEY S. 2016. *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds. J Vet Sci Technol. 7(3):1-7. <<https://dx.doi.org/10.4172/2157-7579.1000324>>
- YAMAN S. & SAHAN YAPICIER O. 2019. Diagnosis of *Gallibacterium Anatis* in Layers: First Report in Turkey. Rev. Bras. Ciênc. Avic. 21(3):1-8. <<https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1019>>

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO ÁREA DE
 PATOLOGIA/ORNITOPATOLOGIA VETERINÁRIA
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE
 Telefone: (81) 3320-6420/6445

QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO PARA *Gallibacterium ssp.*

FICHA Nº: _____ PROPRIEDADE Nº _____
 DATA: ____/____/____.
 INVESTIGADOR (A): _____
 IDENTIFICAÇÃO: _____
 Granja: _____ Proprietário: _____
 Endereço: _____
 Município: _____
 Contatos: _____
 Técnico Responsável: _____
 Coordenada geográfica: _____
 Área: () Urbana () Rural () Peri-Urbana

DADOS DA GRANJA:

1) Tipo de exploração:

Carne - Frangos de corte (FC) () Ovos -
 Poedeira comercial (PC) ()

2) Quantidade de aves no galpão

FC: _____
 PC: _____

3) Linhagem das aves –FC/PC:

- a) Cobb
- b) Ross
- c) Hy-Line
- d) IsaWhite
- e) Outra _____

4) Densidade de aves por m2 (FC)/Gaiola (PC)

- a) 10/4
- b) 12/5
- c) 14/6
- d) ____/____

5) Idade média de retirada das aves
(dias- FC) / (semanas-PC)

- a) 42/____
- b) 45/____
- c) 47/____
- d) 50/____

6) Peso médio do lote

- a) FC _____
- b) PC _____

7) Conversão alimentar

- a) FC _____
- b) PC _____

8) Queda na produção -(%)

- a) FC –carne _____
- b) Ovos _____

9) Ração fornecida

- a) Fase pré-inicial
- b) Inicial
- c) Crescimento
- d) Acabamento

10) Idade das aves no momento da colheita

- a) FC: _____ b) PC: _____

INSTALAÇÕES:

11) Realização de vazio sanitário

- a) Sim
- b) Não

12) Há reutilização da cama aviária

- a) Sim
- b) Não

13) Quantas vezes reutiliza a cama aviária

- a) 2
- b) 3
- c) 5
- d) 7

14) A cama aviária foi tratada

- a) Sim
- b) Não

15) É realizada a desinfecção da granja

- a) Sim
- b) Não

MANEJO SANITÁRIO:

21) Realização de vazio sanitário

- a) Sim
- b) Não

22) Lote anterior apresentou sinais clínicos

- a) Respiratório
- b) Digestivo
- c) Neurológico
- d) Reprodutivo
- e) Ausente

23) No lote anterior, suspeita clínica de doença

- a) Viral
- b) Bacteriana
- c) Fúngica
- d) Parasitária

25) Houve diagnóstico da suspeita clínica/ Qual?

- a) Sim/ _____
- b) Não

26) Morbidade/Mortalidade

_____ / _____

16) Já observou ratos no local de armazenamento de ração

- a) Sim
- b) Não

17) Já observou outras espécies de aves no local, como:

- a) Pombos
- b) Pardais
- c) Outros _____

18) Fonte de água

- a) Águatratada
- b) Córregos e riachos
- c) Açudes
- d) Poço

19) Galpão

- a) Pressão negativa
- b) Pressão positiva
- c) Aberto
- d) Aberto e manejo de cortina

20) Descarte de aves mortas

- a) Compostagem
- b) Fossa asséptica
- c) Incineração

27) Aves doentes foram isoladas

- a) Sim
- b) Não

28) As aves foram medicadas

- a) Sim
- b) Não

29) Medicamento/ Dose / Tempo

30) O programa vacinal/Vacina é utilizado para:

- a) Doença de Marek () / _____
- b) Doença de Newcastle () / _____
- c) Pneumovírus () / _____
- d) EDS () / _____
- e) Micoplasmose – MG () / MS ()
- ConnF, ts-11, 6/85 e MG-70/ MS-H
- f) Coriza infecciosa () / _____
- g) BIG () / _____
- h) DIB () / _____
- i) Outra(s) / _____

GRAPHICAL ABSTRACT

Pesquisa de *Gallibacterium anatis* em frangos de corte e poedeiras comerciais

