

**ESTUDO SOBRE A CORIZA INFECCIOSA
DAS GALINHAS.
I. CARACTERES CULTURAIS,
BIOQUÍMICOS E SOROLÓGICOS DE
17 AMOSTRAS DE
HAEMOPHILUS ISOLADAS NO
BRASIL ***

HIDEMI NARITA
Estagiário, docente voluntário

OSMANE HIPÓLITO
Professor Titular
Assessor do D.T.C. Embrapa, Brasília

JOSÉ AMÉRICO BOTTINO
Professor Livre Docente
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

NARITA, H.; HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J.A. Estudo sobre a coriza infecciosa das galinhas. I. Caracteres culturais, bioquímicos e sorológicos de 17 amostras de *Haemophilus* isoladas no Brasil. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.Paulo*, 17(1/2):29-31, 1980.

RESUMO: Dezesete amostras de organismos do gênero *Haemophilus* isoladas de galinhas com sintomas clínicos de coriza infecciosa foram obtidas do seio infra-orbitário de aves com infecção natural. Os organismos cresceram bem no meio Ágar-20 e no meio líquido CMI-20 suplementado com 5% de soro de galinha e 2% de extrato de fermento. Esses organismos microaerófilos exigiam o fator V mas não o fator X. Cinco amostras exigiram soro de galinha além do fator V para o crescimento no meio Ágar-20. Não houve crescimento em passagens seriadas no meio Ágar-20 em condições aeróbise. O *Staphylococcus aureus* foi usado como cultura alimentadora nos isolamentos. Todas as amostras eram catalase e indol negativas. Nenhuma delas produziu indol, H₂S ou gás nem liquez de gelatina. Todas reduziram nitratos a nitritos. Eram Gram negativas, imóveis e apresentavam bipolaridade. Todas fermentaram glucose, manose, fructose, sacarose e destrina mas não fermentaram arabinose, ramnose, galactose, lactose, trealose, rafinose, inulina, adonitol, dulcitol, inositol e salicina. Algumas fermentaram xilose, maltose, manitol e sorbitol. Quinze amostras isoladas foram estudadas sorologicamente e divididas em dois grupos. Oito das amostras representando um tipo sorológico fermentaram a xilose mas sete representando um segundo tipo sorológico deixaram de fazê-lo. Os resultados dos estudos coincidiram bastante com os de outros autores. Pelo fato de não exigirem o fator X mas sim o V, as 17 amostras isoladas e aqui estudadas deveriam ser denominadas *Haemophylus paragallinarum* BIBERSTEIN e WHITE, 1969.

UNITERMOS: Coriza infecciosa, galinhas*, *Haemophilus gallinarum**, *Haemophilus paragallinarum**.

Trabalho apresentado ao XVI Congresso Mundial de Avicultura, Rio de Janeiro, 1979.

Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Cargill.

INTRODUÇÃO

O agente da coriza infecciosa das galinhas foi primeiramente relatado por DE BLIECK⁶ na Holanda e por NELSON¹¹ nos Estados Unidos, em 1932. Durante as últimas três décadas, a partir destes trabalhos, muitos aspectos da coriza infecciosa foram estudados no mundo por muitos investigadores, entre eles ADLER e PAGE¹, BEACH e SCHALM², BORNSTEIN e SAMBERG⁴, CLARK e GODFREY⁵, DELAPLANE e Cols⁷, YAMAMOTO e SOMERSET¹³, KATO e TSUBAHARA¹⁰, HINZ⁹, etc.

As características culturais, bioquímicas e sorológicas das amostras de *Haemophilus* isoladas de galinhas foram estudadas e relatadas por BORNSTEIN e SAMBERG⁴ em Israel, PAGE¹², nos Estados Unidos, KATO e TSUBAHARA¹⁰, no Japão e HINZ⁹, na Alemanha.

A ocorrência da coriza infecciosa tem sido frequente no Brasil por muitos anos e graças às características clínicas bastante típicas com que a doença ocorre nas galinhas, é facilmente reconhecida, porém seu agente etiológico não havia sido ainda estudado entre nós. É uma das mais importantes doenças das aves no presente, ocasionando elevadas perdas econômicas, sem contar as complicações que podem advir resultantes da associação com os agentes da chamada doença respiratória crônica (DRC) das galinhas. Neste relatório, os aspectos globais das características das amostras isoladas foram estudados como contribuição para reduzir as perdas causadas pela coriza infecciosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezesete amostras de *Haemophilus* sp. foram isoladas durante os anos 1976-77 a partir de material coletado diretamente do seio infra orbitário de galinhas com sintomas de coriza infecciosa. Como meios de cultura básicos para o isolamento e manutenção das culturas foram usados meios líquido e sólido preparados com infusão de carne de galinha enriquecidos com soro de galinha e denominados meios CMI-20 e Ágar-20, respectivamente. Como fator V foram utilizados o sal dissódico reduzido de B-nicotinamida adenina dinucleotídeo (Kohjin) e o extrato de fermento. A hemina, utilizada como fator X, foi obtida da Sigma Chemical. Para os estudos sorológicos foram preparados soros imunes em coelhos inoculados com uma suspensão bacteriana ajustada em transmittancia (60% T) com auxílio de um espectrofotômetro Coleman Jr. modelo 6-065 em comprimento de onda de 540 mu. Foram utilizados os métodos de aglutinação lenta e rápida para a determinação dos sorotipos de *Haemophilus* sp.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados (Tabelas 1, 2 e 3) no estudo de 17 amostras de *Haemophilus* sp. isoladas no Brasil de galinhas com coriza infecciosa coincidem em sua maioria com aqueles constatados por HINZ^{8,9}.

Os organismos crescem bem no meio Ágar-20 e no meio líquido CMI-20 suplementado com 5% de soro de galinha e 2% de extrato de fermento. Esses organismos microaerófilos exigiram o fator V mas não o fator X. Cinco amostras exigiram soro de galinha além do fator V para o crescimento no meio Ágar-20. Não houve crescimento em passagens seriadas no meio Ágar-20 em condições de aeróbise. O *Staphylococcus aureus* foi usado como cultura alimentadora nos isolamentos. Todas as amostras eram catalase e indol negativas. Nenhuma delas produziu indol, H₂S ou gás

liquefez a gelatina. Todas reduziram nitratos a nitritos. Eram Gram-negativos, imóveis e apresentavam bipolaridade.

Em nossa investigação somente foram estudadas culturas catalase-negativas e patogênicas mas PAGE¹² e HINZ^{8,9}, incluíram também amostras catalase-positivas e não patogênicas. A diferenciação com respeito à patogenicidade das amostras é fácil quando se toma por base a prova da catalase.

Das 23 amostras estudadas por HINZ^{8,9}, seis exigiram soro de galinha além do fator V e o mesmo aconteceu com cinco das nossas amostras. Entretanto, não foi possível no presente estudo determinar quais os fatores presentes no soro de galinha que são exigidos para o crescimento do *H. paragallinarum*. É bastante interessante notar que, conforme foi também observado por PAGE¹² os organismos do gênero *Haemophilus* que exigiram o fator V adicionado ao meio Ágar-20 cresceram bem no caldo quando o mesmo recebeu também 5% de soro de galinha.

O estudo de 15 amostras pela prova de soro-aglutinação cruzada mostrou a existência de dois grupos sorológicos distintos. Com base nesses estudos as demais amostras isoladas foram também identificadas sorologicamente. Verificou-se ainda que havia acentuada diferença na velocidade de sedimentação da mistura antígeno-anticorpo após a aglutinação e nos títulos aglutinantes entre as amostras dos dois grupos sorológicos.

De acordo com os resultados pode-se concluir pela identidade entre os nosso sorotipo I e o sorotipo A de PAGE¹² e HINZ^{8,9}. Pode-se também assumir a identidade sorológica entre o nosso grupo II e o sorotipo B dos autores citados.

As amostras pertencentes aos dois sorotipos parecem possuir a mesma virulência para produzir a doença experimental em aves susceptíveis. O comportamento das dezesseis amostras isoladas permite classificá-las como *Haemophilus paragallinarum* BIBERSTEIN e WHITE, 1969.

Com respeito à fermentação de carboidratos, todas fermentaram glucose, manose, fructose, sacarose e destrina, mas não fermentaram arabinose, ramnose, galactose, lactose, trealose, rafinose, inulina, adonitol, dulcitol, inositol e salicina. Algumas fermentaram xilose, maltose, manitol e sorbitol.

Esses resultados coincidiram bastante com os dados citados por HINZ^{8,9}. Em primeiro lugar, dez de nossas amostras fermentaram a xilose, o mesmo acontecendo com seis do autor citado. Na prova de fermentação da galactose houve completa coincidência. Mas KATO e TSUBAHARA¹⁰, PAGE¹² e BORNSTEIN e SAMBERG⁴ relataram que nenhuma de suas amostras fermentou a xilose e algumas delas ou todas fermentaram a galactose.

CONCLUSÕES

As dezessete amostras de organismos isolados do seio infra-orbitário de galinhas com doença natural clinicamente diagnosticada como coriza infecciosa exigiam o fator V mas não o fator X para o seu crescimento. Isso leva à conclusão de que tais organismos são idêntidos ao *Haemophilus paragallinarum* BIBERSTEIN e WHITE³, 1969.

Sob o ponto de vista sorológico, as dezessete amostras estudadas foram divididas em dois grupos com base no método da soroaglutinação. O achado curioso foi que a fermentação da xilose, pelo menos no presente estudo, serviu para diferenciar os dois grupos.

TABELA 1. Exigências nutricionais de 17 amostras de *Haemophilus* isoladas de galinha com coriza infecciosa

Meio Ágar-20 suplementado com	Incubação em	
	Aero- biose	Anaero- robiose
1. Cultura alimentadora <i>S. aureus</i>	0/17(*)	17/17
2. 10 ug NADH por ml	0/17	12/17
3. 10% extrato de fermento	0/17	12/17
4. 10 ug de hemina por ml	0/17	0/17
5. 5% de soro de galinha	0/17	0/17
6. 10 ug NADH/ml + 10 ug hemina	0/17	12/17
7. 10 ug NADH/ml + 5% soro de galinha	0/17	17/17
8. 10% extr. fermento + 10% hemina	0/17	12/17
9. 10% extr. fermento + 5% soro galinha	0/17	17/17
10. Controle (sem suplementação)	0/17	0/17

(*) = Nº culturas positivas/ Nº culturas testadas.

TABELA 2: Caracteres bioquímicos de 17 amostras de *Haemophilus* isoladas de galinhas com coriza infecciosa.

Provas bioquímicas	Resultado
1. Xilose	10/17 (*)
2. Maltose	15/17
3. Sorbitol	6/17
4. Manitol	12/17
5. Indol	0/17
6. Catalase	0/17
7. Redução de nitratos	17/17
8. Formação de gás	0/17
9. Liquefação da gelatina	0/17
10. Produção de H ₂ S	0/17

(*) Nº de culturas positivas ou ligeiramente positivas sobre Nº de culturas testadas.

TABELA 3: Relação entre fermentação de xilose e sorotipos de 15 amostras de *Haemophilus* isoladas de casos de coriza infecciosa.

Amostra ou Antígeno	Fermentação da Xilose	Sorotipo I Amostra B-2	Sorotipo II Amostra S-4
M-1	-	+	-
M-2	-	+	-
B-1	-	+	-
B-2	-	+	-
G	-	+	-
M-3	-	+	-
T	-	+	-
B-3	+	-	+
B-4	+	-	+
S-1	+	-	+
S-2	+	-	+
S-3	+	-	+
S-4	+	-	+
M-4	+	-	+
M-5	+	-	+

- Negativo

+ Positivo

NARITA, H.; HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J.A. Studies on infectious coryza of chickens. I. Cultural biochemical and serological characteristics of 17 strains of *Haemophilus* isolated in Brazil. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 17 (1/2): 29-31, 1980.

SUMMARY: Seventeen strains of organisms of the genus *Haemophilus* were isolated from the infra-orbital sinuses of chickens with clinical symptoms of infectious coryza. The isolates grew well in the Agar-20 medium and in the CMI-20 liquid medium supplemented with 5 per cent chicken serum and 2 per cent yeast extract. These organisms required factor V but not factor X for growth in Agar-20 medium. No growth was obtained in serial passages in Agar-20 medium in aerobic conditions. *Staphylococcus aureus* was used as feeding culture for isolation purposes.

All strains were catalase and indol negative. None produced indol, H₂S and gas or liquefied gelatin. All reduced nitrates to nitrites and were Gram negative, immotile and presented bipolarity. All fermented glucose, mannose, fructose, saccharose and dextrin but not arabinose, rhamnose, galactose, lactose, trehalose, raffinose, inulin, adonitol, dulcitol, inositol and salicin. A few fermented xylose, maltose, mannitol and sorbitol.

Nine strains were studied serologically and divided into two groups. All strains of one serological group fermented xylose while none of the other group did it.

Since all strains studied did not require factor X but only factor V they should be classified as *Haemophilus paragallinarum*, BIBERSTEIN e WHITE, 1969.

UNITERMS: Infectious coryza, chickens*; *Haemophilus gallinarum** *Haemophilus paragallinarum**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ADLER, H.E. & PAGE, L.A. *Haemophilus* infections in chickens. II. The pathology of the respiratory tract. *Avian Dis.*, 6:1-6, 1961.
- 2 — BEACH, J.R. & SCHALM, O.W. Studies of the chemical manifestation and transmissibility of infectious coryza of chickens. *Poultry Sci.*, 15: 466-70, 1936.
- 3 — BIBERSTEIN, E.L. & WHITE, D.C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J. Med. Microb.*, 2: 75-78, 1969.
- 4 — BORNSTEIN, S. & SANBERG, Y. The therapeutic effect of streptomycin on infectious coryza of chickens caused by *Haemophilus gallinarum*. II. Isolation and culture of *Haemophilus gallinarum* and some of its biochemical reactions. *Amer. J. Vet. Res.*, 15 : 612-16, 1954.
- 5 — CLARK, D.S. & GODFREY, J.F. Studies of an inactivated *Haemophilus gallinarum* vaccine for immunization of chickens against infectious coryza. *Avian Dis.*, 5 : 37-47, 1961.
- 6 — DEBLIECK, L.A. A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl. *Vet. J.*, 88 : 9-13, 1932.
- 7 — DELAPLANE, J.P.; ERWIN, L.E. & STUART, H. O. The isolation of a *haemophilus* bacillus in pure culture and the reactions of chickens to intranasal inoculation thereof. *J. Agr. Res.*, 52 : 377-83, 1936.
- 8 — HINZ, K.H. Beitrag zur differenzierung von *Haemophilus* stämmen aus Hühnern. I. Mitteilung: Kulturelle und biochemische untersuchungen. *Avian Path.*, 2 (3): 211-29, 1973.
- 9 — HINZ, K. H. Beitrag zur differenzierung von *Haemophilus* stämmen aus Hühnern. II. Mitteilung: Serologische untersuchungen in objektträger — agglutinations — Test. *Avian Path.*, 2 : (4) 269-78, 1973 a.
- 10 — KATO, K. & TSUBAHARA, H. Infectious coryza of chickens. II. Identification of isolates. *Bull. Nat. Inst. Animal Health*, 45: 21-26, 1962.
- 11 — NELSON, J. B. Studies on an uncomplicated coryza of the domestic fowl. I. The isolation of a bacillus which produces a nasal discharge. *J. Exp. Med.*, 58: 289, 1933.
- 12 — PAGE, L.A. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Amer. J. Vet. Res.*, 23: 85-95, 1962.
- 13 — YAMAMOTO, R. & SOMERSETT, D.T. Antibody response in chickens to infection with *Haemophilus gallinarum*. *Avian Dis.*, 8: 441-53, 1964.

Recebido para publicação em: 24/03/80
Aprovado para publicação em: 18/08/80