



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

INCIDÊNCIA DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA*
SYNOVIAE E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA
DE LESÕES DE AERROSSACULITE EM AMOSTRAS DE FRANGOS DE CORTE
DA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL

015/2019

MILENA MENDONÇA DOS SANTOS

BRASÍLIA – DF

JULHO – 2019



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

INCIDÊNCIA DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE LESÕES DE AEROSSACULITE EM AMOSTRAS DE FRANGOS DE CORTE DA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL

MILENA MENDONÇA DOS SANTOS

ORIENTADOR: Dr^a. ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA VETERINÁRIA

BRASÍLIA/DF

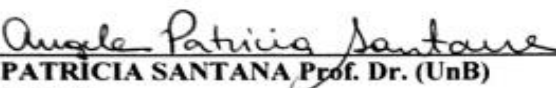
JULHO/2019



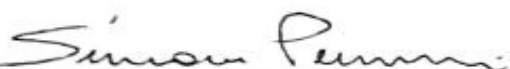
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

MILENA MENDONÇA DOS SANTOS

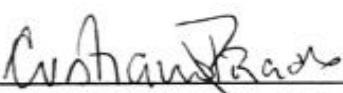
**TESE DE DEOUTORADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM SAÚDE ANIMAL, COMO
REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
SAÚDE ANIMAL**




ANGELA PATRÍCIA SANTANA Prof. Dr. (UnB)
(ORIENTADOR)



SIMONE PERECMANIS Prof. Dr. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)



CRISTIANO SALES PRADO, Prof. Dr. (UFG)
(EXAMINADOR EXTERNO)



GIANE REGINA PALUDO, Prof. Dr. (UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA-DF, 12 DE JULHO DE 2019

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SANTOS, M. M. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 220 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me capacitou para a realização do doutorado.

Manifesto meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o alcance dos seus objetivos, com especial atenção: A prof. Ângela Patrícia Santana, minha orientadora, pelo reconhecimento e estímulo e pela construção conjunta deste trabalho.

Aos profs. Drs. Elmiro Nascimento e Maria Lúcia Barreto, da UFF, pelas inestimáveis contribuições durante a realização deste estudo.

A prof. Carolina Lucci que gentilmente me emprestou seu esteromicroscópio para a visualização dos controle positivos de *Mycoplasma*.

A minha família, que me acompanhou durante toda a jornada.

Aos funcionários do LAMAL, que sempre me auxiliaram ao longo desses 4 anos de desenvolvimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal pela oportunidade de cursar o doutorado.

A CAPES e ao Decanato de Pós-Graduação pelo auxílio financeiro.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Caio César e a minha mãe Olga M. dos Santos!

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 01- Caracterização microbiológica das lesões de aerossaculite condenadas pelo serviço de inspeção oficial de abatedouro frigorífico localizado no Distrito Federal e Entorno.....**28**

Tabela 02- Perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos isolados nas amostras de aerossaculite.....**29**

Capítulo 2

Tabela 01- Número de lotes de frangos de corte acometidos por *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum*, detectado por PCR, ao longo dos meses de julho a novembro do ano de 2017, em abatedouro frigorífico localizado no Distrito federal e Entorno.
.....**44**

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Figura 1 – Aerossaculite em carcaça de frango de corte condenada pelo Serviço de Inspeção Oficial. Formações nodulares, macias, branco Amareladas (seta).....**26**

Figura 2 - Inflamação heterofílica multifocal dos sacos aéreos na parede e no tecido adiposo caracterizado por debris celulares dispostos em camadas (necrose), heterofilos íntegros e degenerados, macrófagos e células gigantes multinucleadas (setas).....**26**

Figura 3 - Inflamação heterofílica difusa no parênquima pulmonar. Presença de restos celulares e ocasionais macrófagos no lúmen de parabrônquios. No parênquima adjacente observou-se infiltrado heterofílico acentuado difuso, que por vezes, substitui o tecido (setas).....**27**

Capítulo 2

Figura 1 - Visualização da PCR para a identificação de *M. gallisepticum* em gel de agarose a 1.5%. M= marcador molecular 100bp; + - controle positivo (fragmento de 481pb); - = controle negativo; 4,5,6,8,12 (setas) = amostras positivas.....**46**

Figura 2 – Visualização da PCR para a identificação de *M. synoviae* em gel de agarose a 1.5%. M= marcador molecular 100bp; + = controle positivo (fragmento de 481pb); - = controle negativo; 1,2,3,6,8,9,10 (setas) = amostras positivas.....**47**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
LAMAL	Laboratório de Análises de Alimentos
FAV/UNB	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1	
RESUMO.....	20
I. INTRODUÇÃO.....	21
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
1. Origem das amostras de aerossaculite de frangos de corte.....	23
2. Histopatologia das amostras de aerossaculite.....	23
3. Isolamento microbiano e antibiograma das amostras de aerossaculite	23
4. Detecção por PCR de <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. synoviae</i> por PCR.....	24
III. RESULTADOS.....	25
1. Histopatologia das amostras de aerossaculite.....	25
2. Isolamento microbiológico das amostras de aerossaculite	26
3. Perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de aerossaculite...29	
4. Detecção de <i>M. synoviae</i> e <i>M. gallisepticum</i> por PCR	30
IV. DISCUSSÃO.....	30
V. CONCLUSÃO.....	33
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 2	
RESUMO	37
I. INTRODUÇÃO.....	38
II. MATERIAIS E MÉTODOS	40
1. Origem e tamanho da amostra.....	40
2. Detecção de <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. synoviae</i> por PCR	40
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
1. Detecção de <i>M. gallispeticum</i> e <i>M. synoviae</i>	42
IV. CONCLUSÃO.....	47
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Os Micoplasmas são procariotos desprovidos de paredes celulares, pertencentes a classe das *Mollicutes*, classe *Tenericutes* e são caracterizados taxonomicamente pelo fenótipo, sorologia e sequência dos rRNA 16S (BROWN *et al.*, 2007). Cerca de 120 espécies diferentes de *Mycoplasma* já foram identificados infectando diferentes organismos, destes, apenas 20 são adaptados para as aves (KLEVEN, 2008). Duas dessas, *Mycoplasma sinoviae* (MS) e *Mycoplasma gallisepticum* (MG) são considerados importantes patógenos que causam doença respiratória, sinovites e aerossaculites em frangos comerciais (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). *Mycoplasma synoviae* tem sido considerado menos importante que o *Mycoplasma gallisepticum* em aves, mas sua importância tem sido destacada em vários estudos (FEBERWEE *et al.*, 2008; LANDMAN, 2014).

O controle de infecção para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* é essencial em todas as fases da cadeia de produção da indústria para evitar a perda de produtividade devido à diminuição da produção/qualidade dos ovos, diminuição da eficiência alimentar e altas condenações de carcaças (KLEVEN, 2008; NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). As micoplasmoses causadas por ambos os agentes fazem parte da lista de doenças de notificação obrigatória exigida pela OIE (Organização Internacional de Epizootias) e da lista de doenças animais de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial (BRASIL, 2013).

Com a promoção da biossegurança, foram adotados programas preventivos, os quais realizam testes sorológicos e / ou bacteriológicos (KLEVEN, 2003). Entretanto o crescimento lento do *Mycoplasma* no cultivo dificulta o isolamento (KLEVEN, 2008). Neste sentido a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido um método mais rápido, efetivo, sensível e econômico do que a técnica de cultura padrão, que tem sido adotada como uma alternativa à cultura tradicional (HACHBIN *et al.*, 2010; HASS *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2005). HACHBIN *et al.*, 2010). Outra importante vantagem dessa técnica é a possibilidade de detecção simultânea de dois ou mais patógenos em uma única reação (multiplex) (SPRYGIN *et al.*, 2010).

A história da micoplasmose aviária no Brasil teve início em meados da década de 50, sendo relatada pela primeira vez por Reis e Nóbrega (1955) em São Paulo, a partir de casos de aerossaculite em galinhas e sinusite infecciosa em perus. Garust e Nóbrega (1956) fizeram os primeiros isolamentos em aves com doença respiratória crônica. Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, as micoplasmoses ocuparam o primeiro lugar entre as doenças

diagnosticadas pela área de Ornitopatologia da Embrapa, sendo isolado *Mycoplasma gallisepticum* de ovos bicados e não nascidos, de galinhas, perus e codornas (METTIFOGO & BUIM, 2009).

Os micoplasmas são parasitas obrigatórios, considerados os menores procariotos já estudados com habilidade de auto-replicação (RAZIN *et al.*, 1998). Possuem um genoma muito pequeno, envolvendo perda de genes não essenciais, incluindo genes de síntese de parede celular, catabolismo e passos metabólicos (BORGES *et al.*, 2007). Sua limitada capacidade genética e a falta de proteínas regulatórias sugere que existem outros meios envolvidos na adaptação e sobrevivência na mudança de hospedeiros (DAVIS & WISE, 2002).

Apesar do genoma simples dos *Mollicutes*, as enfermidades provocadas pelos *Mycoplasmas* são extremamente complexas e relativamente desconhecidas (BAILÃO *et al.*, 2007). Os *Mycoplasmas* colonizam o tecido do hospedeiro provocando resposta imune sistêmica e local, algumas vezes causam imunodepressão e doenças autoimunes (RAZIN *et al.*, 1998). Os principais determinantes antigênicos dos *Mycoplasmas* estão localizados na membrana (KAHANE & RAZIN, 1969). Esses microrganismos possuem fatores mitogênicos para linfócitos o que leva a hiperplasia linfoide peribronquiolar característica da doença (MESSIER & ROSS, 1991).

São também considerados superantígenos (MIMS *et al.*, 1995) capazes de estimular um número excessivo de células B e T pela exposição a vários epítomos simultaneamente, além de se fixarem firmemente à mucosa respiratória do hospedeiro e escapar das defesas (YAMAMOTO, 1994), podendo estar localizado no lúmen, mas ser difícil de ser eliminado (DONE, 1996). Segundo Rottem e Naot (1998), a evasão do sistema imune do hospedeiro é um mecanismo essencial para a sobrevivência do micoplasma. As aves silvestres são pouco susceptíveis a contrair e enfermidade e podem atuar como vetores ou transmissores das micoplasmoses entre as granjas, através do contato direto com as aves de produção ou com a água e/ou alimentos (CERDÁ, 2007).

A aderência do micoplasma às células do hospedeiro é fundamental para o desenvolvimento da infecção (ZIELINSKI & ROSS, 1993; RAZIN, 1998). Micoplasmas mutantes que apresentam deficiência na adesão perdem a capacidade de infectar o hospedeiro (RAZIN, 1999). As proteínas de membrana presentes nos micoplasmas possuem diversas funções, sendo uma delas a adesão (MACHER & YEN, 2007) sendo muitas dessas proteínas consideradas imunogênicas para as galinhas (PYROWOLAKIS *et al.*, 1998). A principal

lipoproteína imunogênica presente em *M. synoviae* é a hemaglutinina VlhA, que quando clivada gera dois fragmentos, as proteínas MSPB e MSPA, sendo estas altamente imunogênicas e indutoras da resposta imune sistêmica e local na fase aguda da infecção (LAVRIC et al., 2007).

A transmissão de MG ocorre através da forma horizontal através do contato direto com secreções respiratória de forma rápida entre aves de um mesmo galpão chegando a 100% em poucas semanas, e pela forma vertical através do oviduto principalmente em aves comerciais dificultando a erradicação dessa enfermidade (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Nas aves domésticas, o reservatório natural de MG e MS são as membranas mucosas do trato respiratório superior e urogenital, respectivamente, das galinhas e perus, enquanto o *M. meliagridis* esteja presente naturalmente nas membranas mucosas do trato genital (cloaca e oviduto) e respiratório dos perus (NASCIMENTO, 2000), caracterizando os problemas, e conseqüentemente, os sinais clínicos respiratórios, articulares e urogenitais (KLEVEN, 2008).

A disseminação horizontal da infecção é em geral muito rápida entre as aves de um mesmo galpão alcançando 100% das mesmas em poucas semanas (CERDÁ, 2007). A transmissão vertical em aves comerciais é uma das principais razões pela dificuldade em controlar e erradicar a enfermidade (CERDÁ, 2007). As manifestações clínicas de *M. gallisepticum* são tosse, corrimento, descarga ocular e nasal, decréscimo no consumo de alimentação, lotes desiguais, queda na produção de ovos e variável mortalidade (Nascimento & Pereira 2009). Nas aves reprodutoras adultas, ocorre a forma crônica ou subclínica com baixo impacto nos índices produtivos (METTIFOGO & FERREIRA, 2006) por outro lado, normalmente as aves infectadas e em estado agudo transmitem à sua progênie uma alta concentração de micoplasmas, e a taxa de transmissão pode variar entre 10 a 40% (CERDÁ, 2007).

No Brasil, o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA – 2006) recomenda vários procedimentos de campo e laboratório para o controle eficaz desses patógenos em criações de aves comerciais. Estes procedimentos incluem o monitoramento sorológico regular nos rebanhos usando placa rápida de Teste de Aglutinação (RPA), ELISA ou inibição da hemaglutinação (HI) (KLEVEN, 2008). Como estes testes de rotina têm limitações de precisão, é necessário para confirmar os resultados com procedimentos mais especializados, como o isolamento microbiológico e ensaio de Reação em cadeia da polimerase (PCR) (KLEVEN, 2008).

O Brasil ocupa a segunda posição no ranking mundial dos maiores produtores de carnes de frango, sendo superado apenas por Estados Unidos (ABPA, 2018). Segundo o IBGE (2018) no Distrito Federal o número de aves alojadas em dezembro de 2018 era de aproximadamente 9.032.684 aves, entre matrizes, frangos de corte, poedeiras, codornas e angolas. Por estes motivos torna-se relevante estudos que envolvem a sanidade avícola, estando as micoplasmoses entre as enfermidades de interesse com relação ao controle sanitário dos lotes de frangos de corte, sendo a detecção dos agentes envolvidos nessa enfermidade de grande importância para maior contribuição do desenvolvimento da avicultura do Distrito Federal e Entorno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILÃO, A. M.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. de A. Kinases of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*: An overview. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.1, p. 219-224, 2007.
- BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. de A. Identification of the GTPase superfamily in *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n.1, p. 212-218, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Saúde Animal, Coordenação Geral de Combate às Doenças, Coordenação de Sanidade Avícola. **Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle**. Versão 1.3, julho/2009.
- BROWN, D. R., WHITCOM, R. F., BRADBURY, J. M. (2007) Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **Int J Syst Evol Microbiol** 57:2703-2719.
- CERDÁ, R.O. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis em Latinoamérica. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA. Porto Alegre **Anais...** Porto Alegre: Centro de Eventos Fingers, p.111-124. 2007.
- DAVIS, K. L. & WISE, K. S. (2002) Site-specific proteolysis of the MALP404 lipoprotein determines the release of a soluble selective lipoprotein-associated motif-containing fragment and alteration of the surface phenotype of *Mycoplasma fermentans*. **Infect Immun** 70: 1129–1135.
- DONE, S.H. Enzootic pneumonia (Mycoplasmosis) revisited. **Pig Journal**, v.38, p.40-61, 1996.
- FEBERWEE, A., DE VRIES, T.S., LANDMAN, W.J., 2008. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. **Avian Pathol** 37, 629-633.
- GARCÍA M, IKUTA N, LEVISOHN S, KLEVENS H. (2005) Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Avian Dis** 49:125-132.
- GARUST, A.T.; NOBREGA, O. Doença crônica respiratória no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.23, p.35-38, 1956.
- HAGHBIN, N. H., POURBAKHS, S. A., CHARKHKAR, S., SHEIKHI, N., ASHTARI, A., 2010. Isolation and detection of *Mycoplasma synoviae* from seropositive rapid reaction broiler breeder flocks by polymerase chain reaction and culture methods. **Vet Res** 6, 31-35. Haghghi.
- HESS, M., NEUBAUER, C., HACKL, R. (2007) Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. **Avian Pathol** 36:127-133.

KAHANE, I.; RAZIN, S. Immunological analysis of micoplasma membranes. **Journal Bacteriology**, v.100, p.187-194, 1969.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J., FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 11 th., p. 719-721. 2003.

KLEVEN, S.H. Control of Avian Mycoplasma Infections in Comercial Poultry. **Avian Diseases**, v.52. p.367-374, 2008.

LANDMAN, W.J., 2014. Is Mycoplasma synoviae outrunning Mycoplasma gallisepticum? A viewpoint from the Netherlands. **Avian Pathol** 43, 2–8.

LAVRIC, M.; BENCINA, D.; KOTHLOW, S.; KASPERS, B.; NARAT, M. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1_β in chicken macrophages. **Veterinary Microbiology**, 121, p. 278-287, 2007.

MACHER, B. A & YEN T. Y. Proteins at membrane surfaces – a review of approaches. **Mol. Biosyst.**, 3(10): 705-713, 2007.

METTIFOGO, E.; BUIM, M.R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. E ORGANIZADORES. **Patologia Aviária**. Editora Manole LTDA., Barueri-SP, p.86-100. 2009.

MESSIER, S.; ROSS, R.F. Interations of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranas with porcine lymphocytes. **American Journal of Veterinary Research.**, v.52, p.1497-1502, 1991.

MIMS, C.A.; PLAYFAR, J.H.; ROIT, I.M.. Estratégias para a sobrevivência dos parasitas e persistência da infecção. In: JAWETZ, E. **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, p.15.1-15.12, 1995.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 800p. 2000.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J.; ROSSINI, L.I. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, p.485-500. 2009.

PYROWOLAKIS, G., HOFMANN, D., HERMANN, R. The subunit b of the FOF1-type ATPase of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* is a lipoprotein. **J Biol Chem. Sep 18;273(38): 24792-6. 1998.**

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of *Micoplasmas*. **Microbiology Molecular Biology reviews**. v. 62, p. 1094-1156, 1998.

REIS, S.; NOBREGA, P. **Tratado de Doenças das Aves**. 2nd: 234. São Paulo: Instituto Biologico, 1955.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 436-440, 1998.

SPRYGIN A. V, ANDREYCHUK D. B, KOLOTILOV A. N, VOLKOV M. S, RUNINA I. A, MUDRAK N. S, BORISOV A. V, IRZA A. N, DRYGIN V. V, PEREVOZCHIKOVA N. A. (2010) Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. **Avian Pathol** 39:99-109.

YAMAMOTO, R. Mollicutes. In: BIBERSTEIN, E.L.; ZEE, Y. **Tratado de microbiologia veterinária**. Zaragoza: Editorial Acribia. 1994. P.241-249.

ZIELINSKI, G .C. & ROSS R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. **Am. J. Vet. Res.**, 54(8): 1262-1269, 1993.

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE LESÕES DE AEROSSACULITE EM FRANGOS DE CORTE PROVENIENTES DE ABATEDOURO FRIGORÍFICO LOCALIZADO NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO.

RESUMO

A aerossaculite é uma das principais causas de condenações de carcaças na indústria da carne avícola. Numerosas espécies são responsáveis pelo desenvolvimento desta lesão, entre elas a *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS). O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização histopatológica e microbiológica, bem como detectar por PCR os agentes *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* em lesões de aerossaculites de amostras de frangos de corte da região do Distrito Federal. Foram coletadas 15 amostras compostas por lesões de aerossaculites, classificadas pelo serviço Inspeção Sanitária Federal, em abatedouro localizado no Distrito Federal para realização da caracterização histopatológica, microbiológica e PCR para MG e MS. As amostras eram compostas por fragmentos de pulmão, traqueias e sacos aéreos. Um total de 32 cepas bacterianas foram detectados, e o isolamento de dois ou mais gêneros bacterianos na mesma amostra foi observado. Os microrganismos isolados foram *Escherichia coli* 59,38% (15/15), seguido por *Staphylococcus coagulase negativa* 25% (8/15), *Enterobacter agglomerans* 9,38% (3/15) e *Pasteurella multocida* 6,25% (2/15). Nas quatro lesões de sacos aéreos consideradas severas pelo serviço de inspeção oficial e na caracterização histopatológica, mais de um microrganismo foi isolado. Foi observado resistência antimicrobiana em todos os gêneros bacterianos isolados. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de MG e / ou MS por PCR. Esses resultados chamam a atenção para o provável uso inadequado de agentes antimicrobianos em frangos do presente estudo. Estudos adicionais devem ser realizados na associação desses microrganismos com esse tipo de lesão respiratória, que tem importante impacto econômico e sanitário na avicultura.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil alcançou a posição de segundo maior produtor mundial de carne de frango, com 13,05 milhões de toneladas produzidas em 2017, e o maior exportador mundial, exportando 4.320 mil toneladas no mesmo ano, de acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018). É estimado que mais de 90% da produção Brasileira de carne de frango esteja ligado a esse sistema de integração e de cooperativas, que vai desde a produção do ovo fértil até o abate, onde o produtor e a empresa são responsáveis por suas partes no processo produtivo (MENDES & SALDANHA, 2004).

Com a alta do setor avícola no contexto nacional e mundial, houve a necessidade da padronização e normatização das ações de acompanhamento sanitário pela Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994, que consolidou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), do Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 2017). Os cuidados com a sanidade acompanham esse crescimento anual da indústria avícola brasileira, mas apesar de toda essa atenção, agentes respiratórios que afetam o peso e a qualidade da carcaça, continuam a provocar grandes prejuízos à avicultura industrial (MACHADO *et al.*, 2014).

Um dos maiores desafios para os produtores de frango brasileiros é reduzir as perdas econômicas causadas pela condenação de carcaças em matadouros frigoríficos, dentre elas a aerossaculite (KABIR, 2010). Inúmeras espécies de microrganismos são responsáveis pela aerossaculite, incluindo a *Escherichia coli*, e é comum a identificação de mais de um agente infeccioso em um surto (ZUO *et al.*, 2018). De acordo com Machado et al (2014) a presença de *Escherichia coli* pode ser suficiente para causar problemas no sistema respiratório de frangos de corte. A colibacilose em frangos pode ser sistêmica ou localizada, e as cepas envolvidas são designadas como patogênica aviária (APEC) (NOLAN *et al.*, 2009). A pericardite, aerossaculite e perihepatite associadas à septicemia por APEC tem a via respiratória como a principal forma de contaminação destes animais (DZIVA *et al.*, 2008).

É importante ressaltar duas espécies de *Mycoplasma*, sendo o *M. synoviae* e *M. gallisepticum* considerados importantes agentes causadores de doenças respiratórias, sinovite e aerossaculite em frangos comerciais, sendo essencial o controle desses agentes (NASCIMENTO & PEREREIA, 2000). Também é de grande importância o controle das micoplasmoses causadas por ambos os agentes, pois os mesmos fazem parte da lista de doenças de notificação obrigatória exigida pela OIE (Organização Internacional de Epizootias) e da lista

de doenças animais de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial (BRASIL, 2013). As progênes de aves reprodutoras afetadas por *M. gallisepticum* e *M. synoviae* costumam ser descartadas devido a lesões em sacos aéreos (METTIFOGO & FERREIRA, 2006).

As aves com aerossaculite apresentam baixo peso o que leva à desuniformidade dos lotes na linha de abate, e conseqüentemente aumentam os riscos de contaminação das carcaças durante a evisceração (RUSSEL, 2003). A portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, estabelece que as carcaças que tiverem o acometimento extensivo dos sacos aéreos por aerossaculite devem ser condenadas totalmente, e as carcaças menos afetadas podem ser condenadas parcialmente após a remoção de todo o exsudato e tecidos envolvidos (BRASIL, 1998).

Em um estudo realizado em abatedouro frigorífico localizado no estado de São Paulo, entre 1996 e 2005, foi identificada a aerossaculite como uma das causas de condenações em carcaças de frangos de corte (MORETTI *et al.*, 2010), outro estudo realizado nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Paraná e Santa Catarina também apontaram a aerossaculite como uma das principais causas de condenações de carcaças em matadouros frigoríficos (EBLING & BASURCO 2016; MACHADO *et al.*, 2014; PASCHOAL 2012). No Brasil, existem relatos do aumento das condenações de aves em matadouros pela presença de aerossaculite, que na sua maioria, pode ser decorrente de infecção pelo *M. gallisepticum* e *M. synoviae* e/ou em associação principalmente com *Escherichia coli* (MINHARRO *et al.*, 2001; BRANCO 2004). Na região Centro Oeste, Minharro *et al* (2001) relatam que durante o período de janeiro a agosto de 1999, em dois dos três abatedouros frigoríficos registrados do estado de Goiás a presença de *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e a presença de *Escherichia* em sacos aéreos.

Não há estudos sobre a caracterização histopatológica e microbiológica de aerossaculite na região do Distrito Federal e Entorno, considerando que esta região representa 1,16% (ABPA, 2018) das exportações de carne de frango do país, e sendo a aerossaculite uma doença de grande importância econômica no de avicultura, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização histopatológica, promover o isolamento microbiológico e a detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em lesões de aerossaculite em frangos de corte provenientes de abatedouro frigorífico localizado na região do Distrito Federal e Entorno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras de aerossaculite de frangos de corte

Foram coletadas 15 amostras de lesões de aerossaculites que ocorreram durante o período de observação em abatedouro frigorífico localizado na região do Distrito Federal. As lesões foram classificadas segundo o serviço de Inspeção Oficial da indústria. As coletas foram realizadas nas carcaças retiradas da linha de abate, para inspeção e posterior condenação das partes afetadas de acordo com a portaria de nº 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998), que ocorreram entre os meses de outubro de 2017 a março de 2018. As mesmas eram compostas por fragmentos de pulmão, traqueia e sacos aéreos, que foram devidamente identificadas, posteriormente acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para os Laboratórios de Microbiologia de Alimentos da FAV/ UnB e Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Agronomia e Veterinária (FAV/UnB).

2.2 Histopatologia das amostras de aerossaculite

As quatro (4) amostras colhidas no momento do descarte das carcaças das aves condenadas por aerossaculite pelo serviço de Inspeção Oficial e consideradas severas pelo mesmo, foram fixadas em formalina tamponada a 10% e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária, para serem processadas e incluídas em blocos de parafina, seccionadas a 5 µm de espessura e as lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE).

2.3 Isolamento microbiano e antibiograma das amostras de aerossaculite

A metodologia utilizada para o isolamento microbiológico foi descrita por Konemman et al. (2001) e por Oliveira (2000). As 15 amostras de sacos aéreos foram devidamente identificadas e plaqueadas direta e individualmente no meio de cultivo Agar Sangue (BioRad®) e incubadas a 37°C em estufas bacteriológicas (Quimis®) por 24 horas. Posteriormente, as colônias distintas foram separadas e plaqueadas individualmente em placas de Agar nutriente (Acumedia®) para a identificação bioquímica, utilizando-se para isto os seguintes meios de cultivo e testes bioquímicos: teste de oxidase, catalase, análise pelo método de GRAM e teste de KOH a 3%, TSI (Triple Sugar Iron), uréia, fenilalanina, citrato, indol, vermelho metila, arginina, lisina, gelatina, manitol, trealose, glicose e sacarose. Para as colônias GRAM positivas, foi utilizado o meio de cultura Baird-Parker (HIMEDIA®). Foram então realizadas leitura e interpretação das provas bioquímicas de acordo com Oliveira (2000) e Koneman et al. (2001) para a identificação das espécies.

Para cada colônia isolada e identificada foi realizado o teste de antibiograma, através do método de disco de difusão, conforme recomendado por “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2016). As bases farmacológicas analisadas foram Amoxicilina (10mcg), Ampicilina (10mcg), Ácido Nalidíxico (30mcg), Cefalexina (30mcg), Cefalotina (30mcg), Cefazolina (30mcg), Ceftazidima (30mcg), Ciprofloxacina (5mcg), Cloranfenicol (30mcg), Doxiciclina (30mcg), Enrofloxacina (5mcg), Eritromicina (15mcg), Estreptomicina (10mcg), Gentamicina (10mcg), Neomicina (30mcg), Sulfonamida (300mcg), Teicoplanina (30mcg), Tetraciclina (30mcg) e Vancomicina (30mcg), sendo todas da marca SENSIFAR®.

Para a realização do inóculo, foram selecionadas de três a cinco colônias isoladas e identificadas em ágar nutriente, e em seguida transferidas para um tubo contendo entre 4 e 5 mL do caldo TSB (Caldo triptona de soja; HIMEDIA®), sendo incubado a 35°C até alcançar a turbidez de 0,5 na escala padrão McFarland (Nefelobac – Probac do Brasil). Após esse período, um swab estéril foi mergulhado no caldo TSB e posteriormente o mesmo foi plaqueado em ágar Müeller-Hinton (HIMEDIA®), esfregando-se o swab em toda a superfície do ágar. Em seguida, com o uso de uma pinça anatômica esterilizada, foram distribuídos os discos de antimicrobianos por igual em cada placa de 100x20mm, de maneira que o centro dos discos de antibióticos entre um e outro não exceda 24 mm, conforme previamente recomendado por CLSI (2016). Após este procedimento, as mesmas foram incubadas sob a temperatura de 35°C por 18 horas.

2.4 Detecção por PCR de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* por PCR

Para a detecção de MG e de MS, foi utilizado uma alíquota de 10µ de cada amostra de aerossaculite maseadas em cadinhos com auxílio de um pistilo estéreis em 1ml de caldo PPLO (Rimedia®). A extração do DNA foi feita por fervura a 100°C e o DNA foi quantificado em 10 ng. Empregou-se a técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos espécie-específicos, cujas sequências de pares de bases foram previamente selecionadas e validadas por Lauerman (1995) para a amplificação de fragmentos do gene que codifica o gene 16S rRNA. Portanto, para o MG, utilizaram-se os *primers* B1 “Forward” (5’-CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC-3’), e o B2 “Reverse” (5’- GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT - 3’), para a amplificação de fragmento de 481 pares de bases. Para o MS, utilizaram-se os *primers* MS-f “Forward” (5’ GAGAAGCAAATAGTGATATCA -3’) e o MS-r “Reverse” (5’- CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A -3’) para a amplificação de fragmento de 207 pares de bases.

A reação da PCR foi realizada em um volume total de 25 µl de reação contendo 10 ng de DNA extraído de cada amostra isolada, com concentração final de 3,0 mM MgCl². Utilizou-se a concentração final de dNTP 2,0 mM, com 10 pmol de cada primer reverso e forward e 1 U de polimerase Taq (Invitrogen®). As condições de amplificação para o MG foram baseadas no protocolo de Lauerman (1995) onde a temperatura de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidas por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de amplificação a 72°C por 5 minutos. E as condições de amplificação para MS foi de sendo a temperatura de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidas por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos e um ciclo final de amplificação a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados e foto-documentados em aparelho transiluminador (Biorad®).

Para o controle positivo, foram utilizadas cepas de *M. synoviae* e *M. gallisepticum* gentilmente fornecidas pela professora Dra. Maria Lúcia Barreto responsável núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense, os quais foram inoculadas em meio Frey modificado e incubadas a 37°C por 48 horas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FAV\UnB, para verificação da viabilidade do cultivo e qualidade do meio Frey modificado.

3. RESULTADOS

3.1 Análise histopatológica das amostras de aerossaculite

Macroscopicamente, das quinze (15) lesões observadas em sacos aéreos observadas, quatro (4) foram caracterizadas por formações nodulares, macias, branco-amareladas, e ao corte o material caseoso apresentava-se em lamelas concêntricas (Fig 1). As demais onze (11) amostras das lesões dos sacos aéreos apresentaram colorações esbranquiçadas e espessamentos dos sacos aéreos. Os pulmões se apresentavam coloração difusamente vermelho-acastanhados, com pontos brancos milimétricos multifocais. Microscopicamente, as 4 lesões dos sacos aéreos consideradas mais severas foram caracterizadas por debris celulares dispostos em camadas, caracterizando necrose, com heterofilos íntegros e degenerados, macrófagos e células gigantes multinucleadas. Nos pulmões destas 4 amostras (consideradas severas pelo serviço de inspeção oficial) observaram-se restos celulares e infiltrado heterofílicos e ocasionais macrófagos no lúmen de parabrônquios. No parênquima adjacente observou-se infiltrado heterofílico acentuado difuso que por vezes substitui o tecido (Fig 2 e 3).

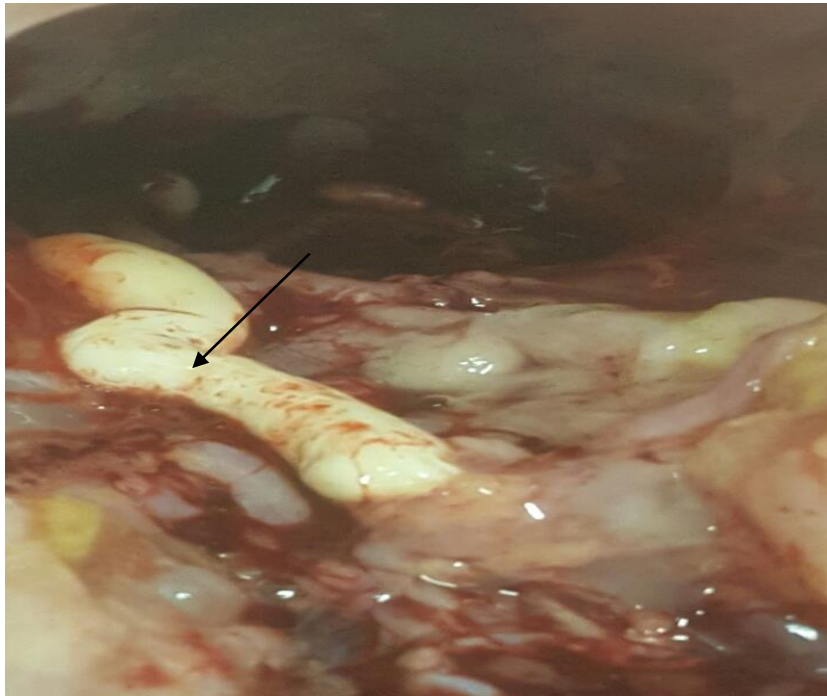


Figura 1 – Aerossaculite em carcaça de frango de corte condenada pelo Serviço de Inspeção Oficial. Formações nodulares, macias, branco-amareladas (seta).

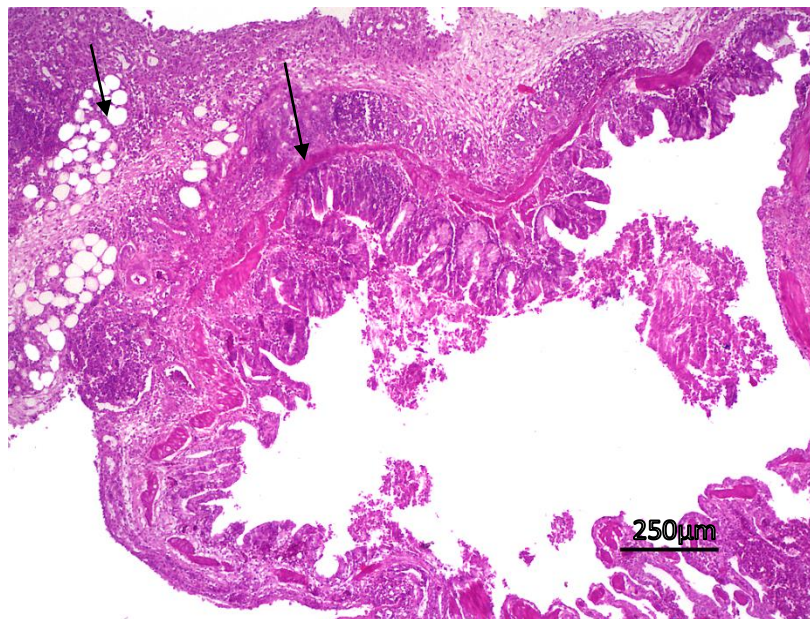


Figura 2 – Inflamação heterofílica multifocal dos sacos aéreos na parede e no tecido adiposo caracterizado por debris celulares dispostos em camadas (necrose), heterofilos íntegros e degenerados, macrófagos e células gigantes multinucleadas (setas).

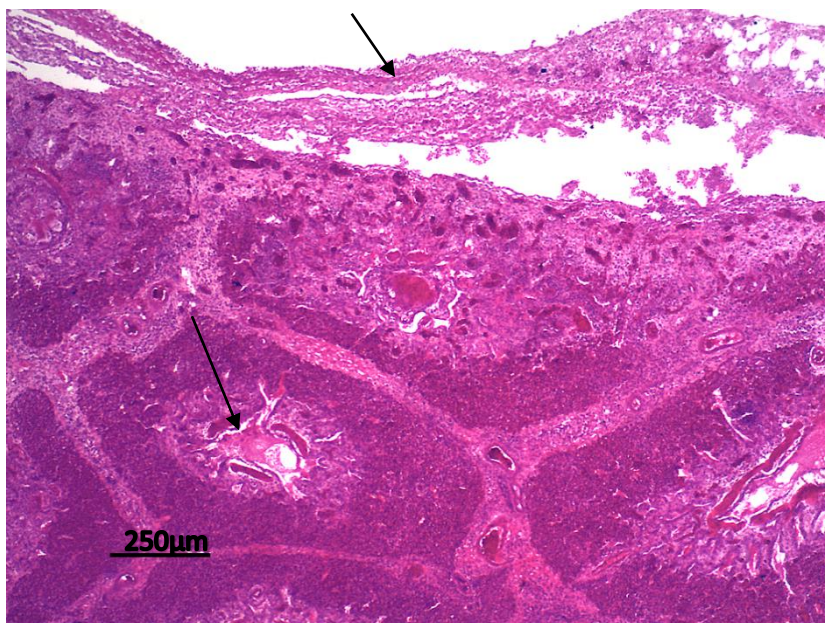


Figura 3 – Inflamação heterofílica difusa no parênquima pulmonar. Presença de restos celulares e ocasionais macrófagos no lúmen de parabônquios. No parênquima adjacente observou-se infiltrado heterofílico acentuado difuso, que por vezes, substitui o tecido (setas).

3.2 Isolamento microbiológico das amostras de aerossaculite

Na caracterização microbiológica das quinze (15) amostras de sacos aéreos analisadas no presente estudo, encontrou-se um total de trinta e duas (32) cepas bacterianas, sendo frequente o isolamento de dois ou mais gêneros bacterianos na mesma amostra. Os microrganismos isolados foram *Escherichia coli* 59,38% (15/15), seguido por *Staphylococcus* Coagulase negativo 25% (8/15), *Enterobacter agglomerans* 9,38% (3/15) e *Pasteurella multocida* 6,25% (2/15). Nas quatro lesões de sacos aéreos consideradas severas descritas na histopatologia foram isolados mais de um microrganismo e em todas as amostras foi isolada a *E.coli* (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização microbiológica das lesões de aerossaculite condenadas pelo serviço de inspeção oficial de um abatedouro frigorífico localizado no Distrito Federal.

Amostras	Composição das amostras	Microorganismos isolados
Lesão severa 1	Sacos aéreos	2 isolados de <i>E. coli</i>
	Pulmão	1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
	Traqueia	1 isolado de <i>Enterobacter agglomerans</i>
		1 isolado de <i>Pasteurella multocida</i>
Lesão severa 2	Sacos aéreos	2 isolados de <i>E. coli</i>
	Pulmão	1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
	Traqueia	1 isolado de <i>Enterobacter agglomerans</i>
		1 cepa de <i>Pasteurella multocida</i>
Lesão severa 3	Sacos aéreos	2 isolados de <i>E. coli</i>
	Pulmão	1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
	Traqueia	1 isolado de <i>Enterobacter agglomerans</i>
Lesão severa 4	Sacos aéreos	2 isolados de <i>E. coli</i>
	Pulmão	1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
	Traqueia	
Lesão 5	Saco aéreo	2 isolados de <i>E. coli</i>
		1 isolados de <i>Staphylococcus sp</i>
Lesão 6	Saco aéreo	2 isolados de <i>E. coli</i>
		1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
Lesão 7	Saco aéreo	2 isolados de <i>E. coli</i>
Lesão 8	Saco aéreo	2 isolados de <i>E. coli</i>
		1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
Lesão 9	Saco aéreo	2 isolados de <i>E. coli</i>
		1 isolado de <i>Staphylococcus sp</i>
Lesões de 10 a 15	Sacos aéreos	1 isolado de <i>E.coli</i>

3.3 Perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de aerossaculite

Foi observada resistência antimicrobiana a 8/19 bases nos três (3) isolados de *Enterobacter agglomerans*, sendo 100% paras as seguintes bases: amoxicilina, ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, eritromicina, enrofloxacina, estreptomicina e a teicoplanina. Dos oito (8) isolados de *Staphylococcus sp.*, quatro (4) apresentaram resistência a 10/19 bases sendo elas a amoxicilina (76%), ampicilina (76%), ácido nalidíxico (100%), doxiciclina (50%), tetraciclina (50%), eritromicina (100%), enrofloxacina (25%), vancomicina (25%) e sulfonamida (50%). Dos dois (2) isolados testados de *Pasteurella multocida*, um foi resistente a 4/19 das bases testadas sendo elas a doxiciclina (50%), tetraciclina (50%), neomicina (50%) e teicoplanina (50%). Com relação aos 24 isolados de *Escherichia coli*, todos foram resistentes a pelo menos uma ou mais das 19 bases testadas.

Tabela 2 – Perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos isolados (em percentual) em amostras de aerossaculite de carcaças de frango condenadas pelo serviço de inspeção oficial em abatedouro frigorífico do Distrito Federal e Entorno.

BASE	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus sp</i>			<i>Enterobacter agglomerans</i>			<i>Pasteurella multocida</i>		
	%			%			%			%		
	n = 24			n = 8			n = 3			n = 2		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMO	62,5		37,5	76	25		100					100
AMP	58,33	41,67		25		76	100					100
NAL	50	20,83	29,17	100			100					100
CFE	50	12,5	37,5			100			100			100
CFZ	50	50				100			100			100
CFL	70,83	20,83	8,34		25	76			100			100
CAZ	16,67	20,83	62,5		50	50			100			100
CIP	37,5	8,33	54,17		25	76	100					100
DOX	45,83	12,5	41,67	50		50			100	50		50
TET	70,83	4,17	25	50		50			100	50		50
CLO	20,83	18,33	60,84			100			100			100
ERI	66,67	29,16	4,17	100			100					100
ENO	33,3	37,5	29,17	25		76	100					100
EST	75	5,83	19,17			100	100					100
GEN	41,67	4,17	54,17			100			100			100
NEO	33,33	16,67	50			100			100	50		50
VAN	91,66	8,34		25	25	50			100			100
SUL	87,5		12,5	50		50			100			100
TEC	100					100	100			50		50

AMO: amoxicilina; AMP: ampicilina; NAL: ácido nalidíxico; CFE: cefalexina; CFZ: cefazolina; CFL: cefalotina; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; DOX: doxiciclina; TET: tetraciclina; CLO: cloranfenicol; ERI: eritromicina; ENO: enrofloxacina; EST: estreptomicina; GEN: gentamicina; NEO: neomicina; VAN: vancomicina; SUL: sulfonamida; TEC: teicoplanina; R :resistente; I: intermediário; S: sensível.

3.4 Detecção de *M. synoviae* e *M. gallisepticum* por PCR

Nas quinze (15) amostras de lesões de aerossaculite, não foram detectadas por meio da PCR as presenças de *Mycoplasma synoviae* e *M. gallisepticum*.

4. DISCUSSÃO

A aerossaculite é uma doença comum que afeta as aves e sua incidência está relacionada à exposição dos frangos à muitos patógenos, como *Mycoplasma* e *Escherichia coli* e o mau manejo dos lotes avícolas pode ser considerado um fator chave no fornecimento de condições para a ocorrência desta enfermidade (SILVA *et al.*, 2011; KHALDA *et al.*, 2012 e LANDMAN *et al.*, 2014).

A coleta das amostras severas de aerossaculite realizada neste estudo ocorreu no período dos meses de julho a novembro de 2017, estando de acordo com Moretti *et al.* (2010) que no estudo realizado no estado de São Paulo, descrevem a ocorrência de aerossaculite apresentando-se de forma cíclica e sazonal, ocorrendo em maior número nos meses de setembro a janeiro, período semelhante ao do presente estudo. Já Minharro *et al.* (2001) realizaram as coletas de aerossaculites no estado de Goiás entre os meses de janeiro a agosto de 1999, observando um pico em janeiro e outro em julho, sendo esse aumento atribuído a condições climáticas observadas nessas épocas associadas ou não a outros fatores como problemas de manejo.

No presente estudo, as lesões observadas de aerossaculite apresentaram macroscopicamente alterações condizentes com a literatura em relação a esta enfermidade (BACK *et al.*, 2004; BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 2000). As carcaças condenadas apresentaram grau variado de severidade, sendo o padrão mostrado na Figura 1 relacionado a severo comprometimento dos sacos aéreos (BRASIL, 1998). Não foi relatado por parte dos produtores integrados responsáveis pelo lote acometido nenhum sinal clínico das aves afetadas, concordando o que foi observado por Casagrande *et al.* (2017) em um estudo realizado com carcaças totalmente condenadas que apresentaram aerossaculite e ausência de sinais clínicos em um abatedouro sob o Serviço de Inspeção Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul. Já em outro estudo, Casagrande *et al.* (2014) relataram a ocorrência de galinhas de subsistência que apresentavam sinais clínicos respiratórios e ao realizarem a necropsia foi observado a presença de aerossaculite.

As lesões macro e microscópicas da análise histopatológica das lesões dos pulmões das 4 lesões consideradas severas pelo serviço de inspeção oficial do estabelecimento frigorífico

em estudo são distintas das encontradas por Casagrande *et al.* (2017), onde macroscopicamente não apresentaram alterações, mas microscopicamente apresentaram bronquite e broncopneumonia fibrino-heterofílica, já nesse estudo, os pulmões analisados apresentaram lesões macroscópicas (congestão e pontos brancos milimétricos e multifocais) e microscopicamente apresentaram restos celulares e infiltrado heterofílico e ocasionais macrófagos no lúmen de parabrônquios e no parênquima adjacente observou-se infiltrado heterofílico acentuado difuso, que por vezes, substituiu o tecido.

Em um estudo realizado por Aljoburi (2018) foram diagnosticados casos de aerossaculite (12%) dependendo dos sinais respiratórios apresentados, como espirros, dificuldade respiratória e inalação, e quando na condução da necropsia para os casos infectados foi observada congestão da membrana que cobria os sacos de ar estando de acordo com outros autores (BUTCHER *et al.*, 2015; MICHIELS *et al.*, 2016). Os resultados deste presente estudo são os primeiros relatos relacionados a caracterização microbiológica e histopatológica de aerossaculite na região do Distrito Federal.

No isolamento e caracterização microbiológica das lesões de aerossaculite analisadas, os isolados observados foram de *E. coli* e *Staphylococcus sp*, *Enterobacter agglomerans* e *Pasteurella multocida* estando em concordância com Casagrande *et al.* (2017) que também isolaram *E.coli* e *Staphylococcus sp*, além de isolados de *Streptococcus sp* e *Enterococcus sp*, e com Minharro *et al.* (2001) que descreveram a *E. coli* como o microrganismo mais frequente (80,64%) em lesões de sacos aéreos.

O perfil de resistência antimicrobiana da *Escherichia coli* apresentou uma alta porcentagem apresentando isolados resistentes a mais de três classes de antibióticos sendo definidos como multirresistentes, estando em concordância com o estudo realizado por Braga *et al.* (2016) no Estado de Minas Gerais, que obtiveram resultados semelhantes em amostras de osteomielite vertebral e artrites em frangos com relação a resistência à amoxicilina (100%), enrofloxacina (54,5%) e ácido nalidíxico (80%).

A resistência à tetraciclina das cepas de *E. coli* estudadas foi maior (70,83%) em comparação com o estudo (54,5%) de Braga *et al.* (2016). mas em concordância com estudos descritos em outras regiões do Brasil (BARBIERI *et al.*, 2015; KORB *et al.*, 2015) e em outros países, como a China, onde a resistência à tetraciclina atingiu 90% (ZHANG *et al.*, 2012).

Cunha *et al.* (2014) também relataram multirresistência e alta resistência de cepas de *E. coli* à tetraciclina (83%) e também a estreptomicina (60,4%), gentamicina (60,4%) e

eritromicina (82,6%) em aerossaculites em perus no Estado de São Paulo. Por muitos anos, a tetraciclina foi utilizada como prevenção e como promotora de crescimento em aves, mas o uso de antibióticos com esses fins foi proibido desde 2009 no Brasil de acordo com a Instrução Normativa nº26 que aprova o Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário (MAPA, 2013). No estado de Minas Gerais o uso de tetraciclina não é mais recomendado por veterinários de aves devido à sua proibição e a resistência bacteriana (BRAGA *et al.*, 2016). O número de isolados de *E. coli* sensíveis a tetraciclina (25%) no presente estudo pode ter ocorrido pelo uso descontinuado de tetraciclina em aves na região.

A multirresistência observada em um isolado de *Pasteurella multocida* assemelha-se com o estudo realizado por Sellyei *et al.* (2017) na Hungria em amostras de diversas espécies de aves domésticas (perus, patos, galinha, faisão e guiné) sendo observada uma multiresistência semelhante ao presente estudo à doxiciclina, tetraciclina e neomicina. Com relação a resistência encontrada nos isolados de *Staphylococcus sp* coagulase negativa, alguns dos resultados estão em concordância com os resultados encontrados por Aarestrup *et al.* (2000) no estudo sobre a susceptibilidade antimicrobiana e a presença de genes em *Staphylococcus sp* provenientes de frangos na Dinamarca, onde os isolados foram resistentes a eritromicina (24%) e a tetraciclina (47%), esta última correlacionada a presença do gene Tet (k). A verificação da resistência antimicrobiana se torna importante devido aos riscos que podem implicar na saúde pública.

A ausência de detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* por meio da PCR também condiz com os estudos de Casagrande *et al.* (2017) no estado do Rio de Janeiro e com Machado *et al.* (2014) também no estado do Rio de Janeiro. Já Minharro *et al.* (2001) em um estudo realizado no estado do Rio grande do Sul, detectaram por meio de PCR o *M. gallisepticum* (32,25%) e o *M. synoviae* (25,80%) em lesões de sacos aéreos. Casagrande *et al.* (2014) detectaram também a presença de MG e MS por meio de PCR em tempo real correlacionando os resultados desta com a imuno-histoquímica (IHQ) em amostras de suabes de traqueia provenientes de galinhas de criação tipo subsistência, assim como Fraga *et al.* (2013) também detectaram por meio de PCR multiplex em tempo real em amostras de traqueia e suabes de traqueias de poedeiras, frangos e reprodutores.

A ausência de detecção por PCR destes microrganismos neste estudo não permite afirmar que não exista a ocorrência dos gêneros de *Mycoplasma* na região do Distrito Federal, o que infere que maiores estudos devem ser conduzidos para se verificar a real presença ou não

destes agentes devido à importância sanitária e econômica do envolvimento dos mesmos com a sanidade avícola.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou a primeira caracterização histopatológica e microbiológica de amostras de lesões de aerossaculite em frango de corte no Distrito Federal, em que os principais isolados foram os gêneros *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp*, *Enterobacter agglomerans* e *Pasteurella multocida*. Foi constatado a presença de multirresistência antimicrobiana em todos os gêneros bacterianos isolados. Estes resultados chamam atenção para a provável utilização inadequada dos agentes antimicrobianos nas criações de frangos do presente estudo, ou a permanência destes genes nos isolados, sendo necessário mais estudos para a real verificação da origem da resistência observada. O estudo também demonstrou a ausência de detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* nas amostras analisadas. No entanto, maiores estudos devem ser realizados na associação desses microrganismos a esse tipo de lesão respiratória que possui grande impacto econômico e sanitário na avicultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, M. F. et al. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology** 74:353-364.2000.
- ALJOBURI, H. M. U. Survey Study of Most Important Diseases Which Infected the Broiler Farms in Samarra City A. **Journal Tikrit Univ. For Agri. Sci.** Vol. (18) No.(4)131-138. 2018.
- ABPA - Brazilian Association of Animal Protein. Available in: <<http://abpa-br.com.br/noticia/producao-de-carne-de-frango-totaliza-13146milhoes-de-toneladas-em-2015-1545>>. Access in: 28 november. 2018.
- BACK, A. **Manual of bird disease**. 3ed. Cascavel, PR: Column of knowledge , cap. 1, p. 15-71; cap. 2, pag. 75-140.2004.
- BARBIERI, N. L. et al. Molecular characterization and clonal relationships among Escherichia coli strains isolated from broiler chickens with colisepticemia. **Foodborne Pathog Dis.** 2015;12:74–83. doi:10.1089/fpd.20141815. 2014.
- BERCHIERI, JUNIOR & MACARI, M. A. **Bird diseases**. Campinas: FACTA, 2000. Pages.455-469.
- BRAGA, V. F. J. et al. Diversidade de cepas de Escherichia coli envolvidas em osteomielitis vertebrais e artrites em frangos no Brasil. **BMC Vet Research**, 12:140. 2006.
- BRANCO, J.A.D. Manipulação pré-abate e perdas resultantes do processamento de frangos de corte. **Anais Conf. Apinco Cienc. Tecnol.**, 2: pages: 129-142.2004.
- BRAZIL, Programa Nacional de Saúde Avícola - PNSA foi criado no âmbito da Secretaria de Defesa Agropecuária pela Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994, estabelecendo diversos padrões e ações para regulamentar a produção avícola e resguardar o estoque nacional de aves. 1994.
- BRAZIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico do Saneamento Tecnológico e Higiênico-Sanitário. 1998. Inspeção de Carne Avícola. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- BRAZIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Aprova o Regulamento Técnico para a Fabricação, Controle de Qualidade, Comercialização e Uso de Produtos Antimicrobianos para Uso Veterinário. Jornal Oficial da União, Brasília, DF. Seção 1, p. 14.2009.
- BRAZIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. "Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado em alimentos para animais". Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidadedosalimentos/aditivosautorizados>.2013.
- BUTCHER, G. D, JACOB, J. P., MATHER, F. B. Doenças comuns de Aves. **Ciência de Laticínios e Produtos Avícolas**. Pages. 1-12.2015.

CASAGRANDE, A. R. et al. 2014. Immunohistochemical diagnosis and anatomopathological characterization of *Mycoplasma gallisepticum* in subsistence chickens. **Pesq. Vet. Bras.** 34(2):153-161.

CASAGRANDE, A. R. et al. 2017. Anatomopathological and bacteriological characterization in broilers condemned completely by colibacillosis under Federal Inspection Service. **Pesq. Vet. Bras.** 37(9):949-957.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2016.

CUNHA, M.P.V. et al. "Virulence profiles, phylogenetic background, and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from Turkeys with Airsacculitis," **The Scientific World Journal**. Article ID 2890248. 2014.

DÁRC MORETTI, L. et al. Time series evaluation of traumatic lesions and airsacculitis at one poultry abattoir in the state os São Paulo, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**.Vol.94 (2010)231-239.2010.

DZIVA, F. & STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathol.** 37:355–366. 2008.

EBLING, P. D. & BASURCO, V. Analysis of the economic losses resulting from the condemnation of carcasses in the main Brazilian states producing broilers. **Agro-food and Food Science Magazine**. Disponível em: < <http://revista.faiFaculdades.edu.br>>.2006.

FRAGA, P. et al. A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. **Brazilian Journal of Microbiology**.44, 2, pages:505-510. 2013.

KABIR. S. M. L. "Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and publichealthconcerns,"**International Journal of Environmental Research and Public Health**,vol.7,no.1,pages.89–114.2010.

KHALDA, K. A. et al. "Enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies from chickens in the Sudan,"**Sudan Journal of Veterinary Science & Animal Husbandary**,Vol.51,No.1. 2002.

KONEMAN E. **Microbiological diagnosis**. 5ª Ed. Médici. 1465 p.2001.

KORB A. et al. Molecular typing and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates of broilers and handlers in the Metropolitan Region of Curitiba, Paraná. **Pesq Vet Bras.**35:258–64.

LANDMAN, W. J. M. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. **Avian Pathol.** 2014;43:2–8. doi: 10.1080/03079457.2014.881049.2014.

LAUERMAN, L. H. 1998. Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Auburn: **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**.

MACHADO, S. L. et al. *Escherichia coli* in broilers with airsacculitis. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 36(3):261-265, jul/set. 2014.

- MENDES, A. A. & SALDANHA, B. P. S. E. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: A. A. Mendes., A. I. Naas and M. Macari. . **Production of broilers**. Campinas: FACTA, p.13-16.2004.
- METTIFOGO, E. & FERREIRA, P. G. A. Avian mycoplasmosis. pages.147-151. In: Andreatti Filho R.L. (Ed.), Saúde Aviária e Doenças. Roca, São Paulo. 510p. 2009.
- MICHIELS, T. et al. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. **Avian Pathol.**, 45(2): 44-252. 2016.
- MINHARRO, S. et al. A. Involvement of *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in lesions of air sacs in chickens slaughtered in the State of Goiás. **Brazilian Animal Science**.v. 2, n. 2, p. 111-117. 2001.
- NASCIMENTO, E. R. & PEREIRA, A .L. V. Mycoplasmosis, p.485-500. In: Di Fabio J. & Rossini L.I. (Eds), **Bird diseases**. FACTA, Campinas. 2000.
- NOLAN, L. K. et al. Colibacillosis. In: **Diseases of poultry, 13th ed.** SWAYNE. D. E. et al. eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 631–652.2009.
- OLIVEIRA, S. J. S. Practical bacteriological guide: **veterinary microbiology**.2 ed. Canoas: ULBRA. 240 p.2000.
- PASCHOAL, E. C., K. L. OTUTUMI, K. L., SILVEIRA, P. A. Main causes of condemnation in the slaughtering of broilers of a slaughterhouse located in the northwestern region of Paraná, Brazil. **Arch. Scien. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, pages. 93-97.2012.
- RUSSEL, S. M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp and *Escherichia coli*. **Poult. Sci.** 82:1326-1331.2003.
- SELLYEI, B., THUMA, A., VOLOKHOV, D., VARGA, Z. Comparative Analysis of *Pasteurella multocida* Isolates from Acute and Chronic Fowl Cholera Cases in Hungary During the Period 2005 Through 2010. **Avian Diseases**, 61(4):457-465. 2017.
- SILVA, M. C. A. et al. Macroscopic and microscopic aspects of airsacculitis in slaughtered broilers ins Brazil. In: Animal hygiene and sustainable livestock production. Proceedings of the XVth **International Congress of the International Society for Animal Hygiene**. v. 2, Vienna, Austria. 2011.
- ZHANG T. et al. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. **Poult Sci.** 2012;91:2774–7. doi:10.3382/ps.2012-02453.2012.
- ZUO, H. Z. et al. Serosurvey of Avian metapneumovirus, *Orithobacterium rhinotracheale*, and *Chlamydia psittaci* and Their Potential Association with Avian Airsacculitis. **Biomed Environ Sci**, 2018; 31(5):pages 403-406. 2018.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

INCIDÊNCIA DE LOTES DE FRANGOS DE CORTE ACOMETIDOS POR *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO

RESUMO

Os micoplasmas são importantes patógenos aviários, que podem causar tanto doença respiratória como sinovite em aves que resultam em perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi determinar a incidência de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em lotes de frangos de corte oriundos da região do Distrito Federal e Entorno pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram analisados todos os lotes abatidos (57 lotes) durante os meses de julho a novembro, em um dos dois abatedouros frigoríficos do Distrito Federal com Serviço de Inspeção Federal. Foram coletadas, na linha de evisceração, em torno de 10 amostras de traqueias de frangos de corte por lote abatido. Os resultados obtidos da incidência acumulada ao longo do período do estudo foram de 7,02% para *Mycoplasma gallisepticum* e de 35,09% para *M. synoviae*. Observou-se uma concentração maior de número de lotes acometidos por *M. synoviae* durante o mês de outubro. O delimitamento amostral, bem como a técnica de PCR permitiram a detecção de ambos os agentes nos lotes de frangos de corte analisados, sendo este o primeiro relato da presença destes dois agentes na região.

1. INTRODUÇÃO

Os Micoplasmas são procariotos desprovidos de paredes celulares que pertencem a classe dos *Mollicutes*, filo *Tenericutes* e são caracterizados taxonomicamente pelo fenótipo, sorologia e sequência dos rRNA 16S (BROWN *et al.*, 2007). Cerca de 120 espécies diferentes de *Mycoplasma* já foram identificados infectando diferentes organismos, destes, mais de 25 espécies foram isoladas em aves (KLEVEN, 2008). Três delas, o *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma meleagridis* (MM) são agentes patogênicos importantes que causam doença respiratória, sinovite e aerossaculite em aves comerciais, perus dentre outras espécies de animais (KLEVEN, 2008; KLEVEN, 2003). Diagnósticos laboratoriais confirmam o *M. gallisepticum* como o patógeno mais economicamente significativo em frangos (BRADBURY *et al.*, 2005; SCHERER *et al.*, 2011), e a significância da presença de *M. synoviae* vem se intensificando em vários estudos no mundo (FEBERWEE *et al.*, 2008; LANDMAN, 2014).

As aves silvestres são pouco susceptíveis ao contrair a enfermidade e podem atuar como vetores ou transmissores das micoplasmoses entre as granjas, através do contato direto com as aves de produção ou com a água e/ou alimentos (CERDÁ, 2007). O controle de infecção para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* é essencial em todas as fases da cadeia de produção da indústria, para evitar a perda de produtividade devido à diminuição da produção, da qualidade dos ovos, diminuição da eficiência alimentar e altas condenações de carcaças (KLEVEN, 2008; NASCIMENTO & PEREIRA, 2009).

A história de detecção da micoplasmose aviária no Brasil teve início em meados da década de 50, sendo relatada pela primeira vez por Reis e Nóbrega (1955) em São Paulo, a partir de casos de aerossaculite em galinhas e sinusite infecciosa em perus. Garust e Nóbrega (1956) fizeram os primeiros isolamentos em aves com doença respiratória crônica. Em um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, as micoplasmoses ocuparam o primeiro lugar entre as doenças diagnosticadas pelo Setor de Ornitopatologia da Embrapa, sendo isolado *Mycoplasma gallisepticum* de ovos bicados e não nascidos, de galinhas, perus e codornas (METTIFOGO & BUIM, 2009).

Ao considerarmos a posição do Brasil como o segundo produtor e o maior exportador mundial de carne de frango, concluímos que esta condição foi alcançada devido ao crescimento do setor de avicultura, na qualidade e manutenção da sanidade avícola, onde a preocupação com

os aspectos higiênico-sanitários dos produtos também aumentaram no setor de avicultura (MACHADO *et al.*, 2014).

Nas aves domésticas, o *M. gallisepticum* e *M. synoviae* tem predileção pelas membranas das mucosas do trato respiratório superior e urogenital das galinhas e perus (NASCIMENTO, 2000), caracterizando os sinais clínicos respiratórios, articulares e urogenitais (KLEVEN, 2008). O Plano Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994) recomenda vários procedimentos de campo e laboratório para o controle eficaz desses patógenos em criações de aves comerciais. Estes procedimentos incluem o monitoramento sorológico regular nos rebanhos usando placa rápida de Teste de Aglutinação (RPA), ELISA ou inibição da hemaglutinação (HI) (KLEVEN, 2008).

O sucesso dos programas de controle de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* depende da acurácia e de técnicas mais rápidas de diagnóstico, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) a mais recomendada (SPRYGIN *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2013). Pesquisas desses dois agentes tem sido realizadas no Brasil e no mundo, seja pela sua detecção de forma direta ou indireta. Na região do Distrito Federal e Entorno não há relatos de trabalhos de detecção desses agentes, sendo que esta região tem aumentado a produção de frangos de corte, representando 1,28% da exportação avícola do país (EMBRAPA, 2019).

A reação em cadeia da polimerase possui vantagens sobre as técnicas sorológicas pois possibilita tanto a detecção como também a tipificação do agente, em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antimicrobianos, detecção de agentes antes da resposta imunológica e em imunocomprometidos, isso sem a necessidade de cultivo prévio, principalmente ao se tratar de bactérias de difícil cultivo ou que apresentam crescimento lento (MORENO, 2009).

Levando-se em consideração a importância da micoplasmose na produção avícola, relacionada às perdas geradas nos lotes acometidos por esta enfermidade, os poucos trabalhos de detecção direta na região Centro Oeste, no Estado de Goiás e a ausência de trabalhos sobre a presença de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em lotes de frangos de corte na região do Distrito Federal e Entorno, esse estudo teve como objetivo estimar a incidência de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* por PCR, em lotes de frangos de corte abatidos na região do Distrito Federal e Entorno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem e tamanho da amostra

Foram coletadas amostras de todos os lotes de frangos de corte abatidos durante os meses de julho a novembro de 2017, em um frigorífico com serviço de inspeção federal, localizado na região do Distrito Federal. Cabe ressaltar que este estabelecimento abate frangos provenientes de granjas localizadas no DF e na região do Entorno. Foram um total de 10 traquéias coletadas por dia de forma aleatória, na linha de evisceração, após a realização da inspeção federal. Ao todo foram 57 dias de coleta, totalizando 604 amostras de traqueia.

Considerando que o tamanho médio dos lotes da localidade atendida pelo abatedouro frigorífico, era de 57 mil aves, e a capacidade média de abate diária da indústria na época era de 51 mil aves, considerou-se 1 lote/dia, e assumiu-se a independência dos lotes durante esse período de observação. Foi considerado para o delimitamento amostral a exigência de vazio sanitário e desinfecção dos galpões e o controle de recepção de pintinhos de 1 dia. O planejamento amostral, para o número de amostras por lote a serem coletadas, visou estimar um número mínimo de aves a serem examinadas dentro de cada lote, de forma a permitir a sua classificação como infectado ou não infectado por micoplasmas. Para tanto, foi utilizado o conceito de sensibilidade e especificidade agregadas (DOHOO *et al.*, 2003). Para efeito dos cálculos foram adotados os valores de 90% e 100% respectivamente, para a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados (PCR-MG e PCR-MS) e uma estimativa mínima de 30% para a prevalência intra-lote, caso estivesse contaminado. O tamanho da amostra escolhido foi o que permitiu valores de sensibilidade e especificidade de lote iguais ou superiores a 95%.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa STATA® (Statacorp, 2011).

2.2. Detecção de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* por PCR

Para a detecção de MG e de MS foi utilizado uma alíquota de 10µl de cada amostra de traqueia escarificada com o auxílio de um bisturi. O escarificado foi colocado em *eppendorfs* com 50 µl de água Milli-Q. Para a extração foi utilizado o método de fervura a 100°C por 10 minutos. Após a extração o DNA foi quantificado em 10 ng.

Empregou-se a técnica de PCR, utilizando-se pares de oligonucleotídeos espécie-específicos, cujas sequências de pares de bases foram previamente selecionadas e validadas por Lauerman (1995), para a amplificação de fragmentos do gene que codifica o 16SS rRNA.

Portanto, para o MG utilizou-se os primers B1 “Forward” (5'-CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC-3'), e o B2 “Reverse” (5'-GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT - 3'), para a amplificação de fragmento de 481 pares de base. Para o MS utilizou-se os primers MS-f “Forward” (5' GAGAAGCAAATAGTGATATCA -3') e o MS-r “Reverse” (5'- CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A -3') para a amplificação de fragmento de 207 pares de base.

A reação da PCR foi realizada em um volume total de 25 µl de reação contendo 10 ng de DNA extraído de cada amostra isolada e 2µl de tamplate, com concentração final de 3,0 mM MgCl². Utilizou-se a concentração final de dNTP 2,0 mM, com 10 pmol de cada primer reverso e forward e 1 U de polimerase Taq (Invitrogen®). As condições de amplificação para o MG foram baseadas no protocolo de Lauerman (1995) com a temperatura de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidas por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de amplificação a 72°C por 5 minutos. E as condições de amplificação para MS foi de sendo a temperatura de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidas por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos e um ciclo final de amplificação a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados e foto-documentados em aparelho transiluminador (Biorad®).

Para o controle positivo, foram utilizadas cepas de *M. synoviae* e *M. gallisepticum* gentilmente fornecidas pela professora Dra. Maria Lúcia Barreto responsável pelo núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense, os quais por sua vez foram inoculadas em meio Frey modificado e incubadas a 37°C por 48 horas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FAV\UnB, para verificação da viabilidade do cultivo e qualidade do meio Frey modificado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma. synoviae*

Um total de 28 amostras foram positivas para *M. synoviae* e 5 amostras foram positivas para *M. gallisepticum*. A incidência acumulada de lotes acometidos por *Mycoplasma synoviae* ao longo do período de acompanhamento foi de 35,9% (IC95%: 22,91% - 48,90%) e por *M. gallisepticum* foi de 7,2% (IC95%: 1,95% - 17,00%). Nenhum lote foi positivo para ambos os agentes simultaneamente. No Distrito Federal existem dois abatedouros frigoríficos que apresentam Serviço Inspeção Federal, logo este estudo da detecção de MG e MS em frangos de corte realizado em um dos frigoríficos, que apresenta um alojamento mensal aproximado de 1.150.000 de frangos de corte, é representativo para a região, levando em consideração que no Distrito Federal o alojamento total aproximado de frangos de corte no mês de dezembro de 2018 foi de 8.388.258 aves (IBGE, 2018).

Em um estudo epidemiológico realizado por Haesendonck *et al* (2014) na Europa sobre a prevalência de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, foram encontrados valores elevados de prevalência, sendo 73,2% para MG e 96,4% para MS em rebanhos de aves caipiras, sugerindo que esse grupo de aves possa atuar como um potencial reservatório para *Mycoplasma*. Este resultado difere do presente estudo principalmente com relação ao tipo de amostra (aves caipiras), onde os resultados para *M. gallisepticum* foram em maior número, comparado aos resultados do presente estudo realizado em amostras de lotes de frangos de corte. Esta diferença pode estar relacionada com a presença de controle sanitário dos lotes de frangos de corte comerciais.

No Egito, um estudo em lotes de frangos de corte com 57 semanas de idade e com sinais de artrite, detectou em 87,5% das amostras de articulações por meio da PCR a presença de *Mycoplasma synoviae* (AMER *et al.*, 2019), assim como no presente estudo, em que se detectou o MS (35,09%) em frangos de corte. É importante ressaltar que as micoplasmoses podem se espalhar por rotas aéreas ou por contato direto ou indireto, sendo a proximidade do local de criação de galinhas de outros Galliformes, como aves de quintal e galinhas caipiras, uma possível ameaça em potencial de propagação de infecções em explorações comerciais (MICHIELS *et al.*, 2016).

Na Bélgica, um estudo com amostras de frangos e perus comerciais foi observado uma maior prevalência de *M. synoviae* (12,9%) com relação ao *M. gallisepticum* (2,7%), sendo que ambos foram detectados por meio da PCR, estando estes resultados semelhantes aos

encontrados neste estudo (MICHIELS *et al.*, 2016). Um estudo realizado no Instituto de Pesquisa Agropecuária da Etiópia em frangos de corte detectou também por meio da PCR o *M. gallisepticum* e o *M. synoviae* além de outros agentes causadores de doença respiratória em frangos (HUTTON *et al.*, 2017).

No Irã, um estudo também detectou através da PCR a presença de *M. synoviae* e *M. gallisepticum* em amostras de lotes de frangos de corte, sendo o *M. synoviae* (100%) em maior número de amostras em comparação com o *M. gallisepticum* (25%), sendo esse resultado semelhante ao do presente estudo (GHARIBI *et al.*, 2018).

No Brasil, também existem estudos de detecção dos agentes com resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Machado *et al* (2014) em uma pesquisa com 40 lotes distintos de frangos de corte, os quais foram abatidos em abatedouro sob Inspeção Federal localizado no Estado do Rio Grande do Sul, detectaram também por PCR o *Mycoplasma gallisepticum* em 37,5% de amostras de *pools* de traqueias, sendo a diferença apenas nas amostras, já que o presente estudo a PCR foi realizada em amostras de traqueias individuais.

O resultado obtido para detecção de MG também se assemelha com o estudo realizado no Estado de Pernambuco, em que onze granjas de frangos de corte e de poedeiras comerciais, apresentaram PCR e nested PCR positivos para a presença de *M. gallisepticum* em 7 amostras (33,33%) (BARROS *et al.*, 2014), no entanto neste estudo alguns lotes apresentavam sinais clínicos respiratórios, diferente dos lotes do presente estudo que não apresentavam sinais clínicos evidentes na inspeção *ante mortem*.

No estado de Goiás, Minharo *et al* (2001) também detectaram por meio da PCR o *M. gallisepticum* em 10 (32,25%) e o *M. synoviae* em 8 (25,80%) amostras de *swabs* de lesões de sacos aéreos, em frangos de corte abatidos em frigoríficos localizados nos municípios de Itaberaí e Pires do Rio, sob o serviço de Inspeção Federal do MAPA. Fraga *et al* (2013) analisaram um multiplex PCR para a detecção de ambos os mycoplasmas e obtiveram 100% de especificidade e de sensibilidade na análise para MG e 94.7% de especificidade e 100% de sensibilidade para MS. A escolha da PCR como teste diagnóstico para MG e MS no presente estudo levou em consideração a sua capacidade em permitir a observação de possíveis variações gênicas em isolados do gênero *Mycoplasma*, por meio de visualização de fragmentos de variados tamanhos (Figura 1 e 2). Neste estudo não houve a detecção de variações nos tamanhos de fragmentos da PCR tanto para MG quanto para MS.

Segundo Nascimento e Pereira (2009) e Kleven (2008) se faz necessário confirmar os resultados com procedimentos especializados mais adequados como o isolamento e identificação microbiológico e ou por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Entretanto,

os micoplasmas são microrganismos que possuem um crescimento lento sendo considerados fastidiosos e além disso, é comum o desenvolvimento de outras bactérias comensais do mesmo gênero (como *M. gallinaceum* e *M. gallinrum*) no procedimento de isolamento de MG e MS (KLEVEN, 2008).

No presente estudo não foi realizado o cultivo microbiológico dos agentes detectados, para verificar a viabilidade dos mesmos nas amostras positivas para PCR, mas de acordo com um estudo realizado no Paquistão por MUHAMMAD *et al* (2017), que realizaram a comparação da técnica da PCR com a cultura de MS e MG em amostras de traqueias de aves com lesões respiratórias crônicas *post mortem*, concluíram que a PCR é uma ferramenta sensível e confiável para o diagnóstico de micoplasmose aviária em amostras de campo estando quase 100% em acordo com o cultivo dos microrganismos, sendo que a PCR (52%) foi mais eficiente para a detecção de MS do que o cultivo (47%). Conseqüentemente, a PCR vem sendo significativamente usada como teste alternativo para detecção direta de MG e MS em amostras clínicas e outros procedimentos estando presente na literatura científica na última década (RASOULINEZHAD *et al.*, 2018, HESS *et al.*, 2007).

Nos resultados observados para cada mês de coleta de amostras de lotes para detecção de *M. synoviae*, foi observado um aumento progressivo de lotes positivos (Tabela 1), sendo o maior número de lotes positivos observado no mês de outubro. Esse aumento do número de lotes positivos pode ter sido influenciado por características climáticas, sendo de setembro a janeiro a umidade mais elevada, o que predispõe a problemas respiratórios, reduzindo a imunidade das aves (D'Arc MORETTI., et al. 2010). Já para o *M. gallisepticum*, não houve um aumento progressivo como se observou para o *M. synoviae*.

Tabela 1 – Número de lotes de frangos de corte acometidos por *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum*, detectado por PCR, ao longo dos meses de julho a novembro do ano de 2017, em abatedouro frigorífico localizado no Distrito federal e Entorno.

LOTES	MESES				
	Julho MG/MS	Agosto MG/MS	Setembro MG/MS	Outubro MG/MS	Novembro MG/MS
Negativo	10/10	11/11	10/10	5/5	1/1
Positivo	0/0	2/1	4/2	13/2	1/0

Minharro et al (2001) em um estudo com amostras de aerossaculites provenientes de carcaças condenadas em abatedouros frigoríficos localizados no estado de Goiás, observou uma maior frequência da enfermidade nos meses de julho e janeiro (INMET, 2019). Já, no presente estudo, os resultados positivos foram detectados nos meses de agosto, setembro e outubro, estando de acordo com Lovatto (1985) e Minharro et al. (1999), que consideram períodos de chuvas intensas com alta umidade e temperaturas elevadas e épocas de maiores oscilações entre temperaturas máxima e mínima, em associação com a baixa umidade relativa do ar, condições favoráveis à ocorrência da enfermidade, por facilitar a inalação de pó e substâncias químicas como a amônia, que agridem o trato respiratório.

Os resultados de *M. gallisepticum* deste estudo e dos demais estudos relatados, onde se detectou a presença deste agente estão em desconformidade com a legislação, pois as micoplasmoses causadas por ambos os agentes fazem parte da lista de doenças de notificação obrigatória exigida pela OIE (Organização Internacional de Epizootias) e da lista de doenças animais de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial (BRASIL, 2013).

Neste estudo o delineamento amostral permitiu que os dois agentes, tanto o *M. gallisepticum* como o *M. synoviae* fossem detectados nos lotes de frangos de corte abatidos no abatedouro frigorífico, localizado na região do Distrito Federal e Entorno. Sabendo que na região existem apenas dois abatedouros frigoríficos com serviço de Inspeção Federal, este estudo de incidência se torna representativo com relação a situação da presença dos dois agentes em frangos de corte da região do Distrito Federal e Entorno. Existem estudos que detectaram estes agentes no Brasil e no estado de Goiás (Minharro et al, 2001), no entanto este é o primeiro relato destes agentes na região do Distrito Federal e Entorno.



Figura 1 – Visualização da PCR para a identificação de *M. gallisepticum* em gel de agarose a 1.5%. M= marcador molecular 100bp; + - controle positivo (fragmento de 481pb); - = controle negativo; 4,5,6,8,12 (setas) = amostras positivas.

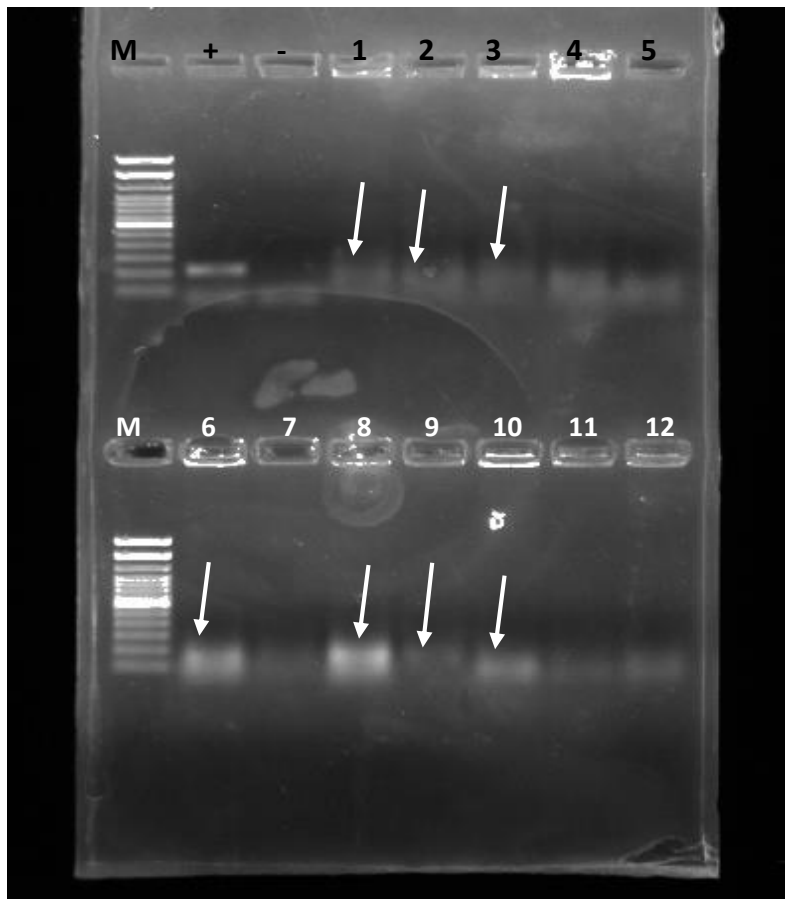


Figura 2 – PCR usado para a identificação de *M. synoviae* em gel de agarose a 1.5%. M= marcador molecular 100bp; += controle positivo (fragmento de 481 pb); -= controle negativo; 1,2,3,6,8,9,10 (setas) = amostras positivas.

4. CONCLUSÃO

O *Mycoplasma gallisepticum* e o *M. synoviae* foram detectados em lotes de frangos de corte abatidos no Distrito Federal e Entorno. Na análise foi estimada a incidência acumulada de 7.02% e 35.9% de lotes positivos para o MG e para o MS, sendo o estudo realizado entre os meses de julho a novembro de 2017. O maior numero de lotes positivos para *M. synoviae* foi observado no mês de outubro, coincidindo com o inicio do período de maior umidade na região em estudo. O uso da PCR como diagnóstico para MG e MS se mostrou uma técnica rápida e sensível para a detecção desses agentes, estando em acordo com a literatura científica. Este estudo tem grande importancia pois é o primeiro que relata a presença desses agentes na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMER, M. M, MEKKY H. M.; FEDAWY H. S. Molecular identification of *Mycoplasma synoviae* from breeder chicken flock showing arthritis in Egypt, **Veterinary World**, 12(4): 535-541.2019.
- BARROS M. R. et al..Occurrence of *Mycoplasma synoviae* on commercial poultry farms of Pernambuco, Brazil. **Pesq Vet. Bras.** 34:953-956, 2014.
- BRADBURY J. M. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. **Br Poult Sci**, 46(2):125-136.2005.
- BRASIL. Ministério da Cultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº193 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e cria o Comitê Consultivo do Programa. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 22 set de 1994.
- BRASIL. Instrução normativa no 50, de 24 de setembro de 2013. O ministro de estado da agricultura, pecuária e abastecimento. Alterar a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal, publicado pelo Decreto no 24.548, de 3 de julho de 1934, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa. 2013.
- BROWN, D. R., WHITCOM, R. F., BRADBURY, J. M. Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). **Int J Syst Evol Microbiol** 57:2703-2719. 2007.
- CERDÁ, R.O. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis em Latinoamérica. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA. Porto Alegre **Anais...**Porto Alegre: Centro de Eventos Fingers, p.111-124. 2007.
- DÁRC MORETTI, L. et al. Time series evaluation of traumatic lesions and airsacculitis at one poultry abattoir in the state os São Paulo, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**.Vol.94 (2010)231-239.2010.
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary epidemiologic research**. Charlottetown, Canadá: Atlantic Veterinary College, 2003. 706p.
- FEBERWEE, A., DE VRIES, T.S., LANDMAN, W.J. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. **Avian Pathol** 37, 629-633.2008.
- FRAGA, A. P. et al. A multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. **Braz. J. Microbiol.** 44:505–510.2013.
- GHARIBI D, GHADIMIPOUR R, MAYAHI M: Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* among Commercial Poultry in Khouzestan Province, **Iran. Arch Razi Inst.** 2018 Jun;73(2):139-146.2018.

GARUST, A.T.; NOBREGA, O. Doença crônica respiratória no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.23, p.35-38, 1956.1956.

HAESSENDONCK, R. et al.. High seroprevalence of respiratory pathogens in hobby poultry. **Avian Diseases**, 58, 623–627.2014.

HESS, M., NEUBAUER, C., HACKL, R. Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. **Avian Pathol** 36:127-133.2007.

HUTTON S, et al. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 2017 Feb;49(2):317-322.2017.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=PP&z=t&o=24>>. Acesso em: 04/07/2019.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia Acesso em: 04/07/2019. www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo2/verProximosDias&code=5300108

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M. et al. D.E. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 11 th., p. 719-721. 2003.

KLEVEN, S.H. Control of Avian *Mycoplasma* Infections in Comercial Poultry. **Avian Diseases**, v.52. p.367-374, 2008.

LANDMAN, W.J. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. **Avian Pathol** 43, 2–8.2014.

LAUERMAN, L. H. 1998. Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Auburn: **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**.

LOVATTO, Z. A. Principais causas de condenações e perdas a nível de abatedouros e sua importância como método de controle de doenças no frango de corte. In: **encontro empresarial de atualização em patologia avícola**, 1., 1985, Campinas, Brasil. Anais... Campinas, 1985.

MACHADO, S. L. et al. *Escherichia coli* in broilers with airsacculitis. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 36(3):261-265, jul/set. 2014.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal. Disponível em: <http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons/!ap_abate_estaduais_cons?p_select=SIM>. Acesso em: 02 dez. 2018.

METTIFOGO, E.; BUIM, M.R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. E ORGANIZADORES. **Patologia Aviária**. Editora Manole LTDA., Barueri-SP, p.86-100. 2009.

- MICHIELS, T. et al. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. **Journal Avian Pathology**. Volume 45. Pages 244-252.2016.
- MINHARRO S. et al. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no estado de Goiás. **Ciê. Anim. Bras.**, 2:111-117, 2001.
- MINHARRO, S et al. Alterações anatomopatológicas macroscópicas detectadas em abatedouros de aves sob Inspeção Federal no Estado de Goiás no período de 1995-1997. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, 1999.
- MORENO A. M. Técnicas moleculares de diagnóstico, p.413-427. In: Revollo L. & Ferreira A.J.P. (Eds), **Patologia Aviária**. Editora Manole, Barueri, SP. 510p.2009.
- MUHAMMAD. et al. Diagnosis of Avian Mycoplasmas: A Comparison between PCR and Culture Technique. **Archives of Razi Institute**, Vol. 73, No. 3.239-244.2018.
- NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A., MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 800p. 2000.
- NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, p.485-500. 2009.
- RASOULINEZHAD, S. et al. detection and phylogenetic analysis of *Mycoplasma gallisepticum* from backyard and commercial turkey flocks in Iran. **Vet. Res. Forum**, 8: 293-298.2017.
- REIS, S.; NOBREGA, P. Tratado de Doenças das Aves. 2nd: 234. São Paulo: **Instituto Biológico**, 1955.
- SCHERER AL, SCHERER JF, PETRY MV, SANDER M. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia** 2011;19:74-79.2011.
- SPRYGIN A. V. et al. Development of a duplex real-time TaqManPCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. **Avian Pathol** 39:99-109.2010.
- WUNDERWALD C., HOOP R. K. Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks. *Avian Pathology*. 2002;31(2):157-162.2002.